DER EINFLUSS VON RIBONUKLEINSÄURE-HYDROLYSAT, ADENIN UND GUANIN AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTAZIDURIE

REINHARD MICHAEL JUSTL

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 201 47 74

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546820_0043

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr.med. Nepomuk Zöllner

Der Einfluß von Ribonukleinsäure-Hydrolysat, Adenin und Guanin auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhard Michael Justl
aus
Augsburg

Jahr
1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Gröbner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. N. Zöllner

Dekan: Prof. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

GLIEDERUNG

1.	Einleitung	S. 1
2.	Pyrimidin- und Purinstoffwechsel	S. 3
2.1.	Pyrimidin-Stoffwechsel	S. 3
2.1.1.	Pyrimidin-Biosynthese de novo	S. 3
2.1.2.	Umwandlung von Pyrimidin-Nukleotiden	S. 5
2.1.3.	Abbau von Pyrimidinverbindungen	S. 7
2.1.4.	Regulation der Pyrimidinsynthese	S. 8
2.1.5.	Störungen des Pyrimidinstoffwechsels des Menschen	S. 9
2.2.	Purinstoffwechsel	S. 11
2.2.1.	Purinsynthese de novo	S. 11
2.2.2.	Abbau der Purine	S. 14
2.2.3.	Die Regulation der Purinsynthese und ihre Störungen	S. 16
3.	Einfluß von Allopurinol auf Pyrimidin- und Purin-Stoffwechsel	S. 23
3.1.	Pharmakokinetik von Allopurinol	S. 23
3.2.	Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Allopurinol	S. 24
3.3.	Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol	S. 27
4.	Problemstellung	S. 29
5.	Methodik	S. 31
5.1.	Diätversuch	S. 31
5.1.1.	Versuchspersonen	S. 31
5.1.2.	Diät	S. 32
5.1.3.	Versuchssubstanzen	S. 35
5.1.4.	Versuchsablauf	S. 36

5.2.	Bestimmungsmethoden	S. 39
5.2.1.	Bestimmung der Harnsäure in Serum und Urin	S. 40
5.2.2.	Bestimmung von Kreatinin im Urin	S. 42
5.2.3.	Bestimmung der Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin	S. 44
5.2.4.	Bestimmung der Orotsäure im Urin	S. 46
5.2.5.	Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms Orotidyldekarboxylase in Erythrozyten	S. 48
5.2.6.	Bestimmung der Aktivität des Enzyms Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase aus Erythrozyten	S. 51
5.2.7.	Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms Adeninphosphoribosyltransferase aus Erythrozyten	S. 54
5.2.8.	Bestimmung der Eiweiß-Konzentration in Erythrozyten	S. 55
6.	Ergebnisse	S. 57
6.1.	Versuchsperson "A"	S. 57
6.2.	Versuchsperson "B"	S. 66
6.3.	Versuchsperson "C"	S. 75
7.	Diskussion	S. 84
8.	Zusammenfassung	S. 86
9.	Literaturverzeichnis	S. 89
Lebenslauf		S. 96

1. Einleitung

Purin- und Pyrimidinnukleotide sind Bausteine der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS). Zwischen der Bildung von Purin- und derjenigen von Pyrimidinnukleotiden müssen enge Beziehungen bestehen, da beide zum größten Teil in annähernd äquimolekularen Mengen in die Synthese der Nukleinsäuren eingehen.

Man unterscheidet Basen, Nukleoside und Nukleotide. Das Mononukleosid setzt sich aus Base und Pentose, das Mononukleotid aus Base, Pentose und Phosphat zusammen. Die verschiedenen in den Nukleosiden und Nukleotiden vorkommenden Basen leiten sich vom Purin und Pyrimidin ab. Durch Substitution von H-Atomen durch Hydroxy-, Amino- oder Methyl-Gruppen entstehen die in Nukleinsäuren vorkommenden Purin- bzw. Pyrimidinbasen. Mononukleoside bestehen aus einer Base und einer Pentose, einer Ribose oder einer Desoxyribose. Durch Veresterung einer Hydroxy-Gruppe der Pentose eines Mononukleosids mit Phosphat entsteht aus einem Mononukleosid ein Mononukleotid. Die Veresterung erfolgt dabei am C-Atom 3 oder C-Atom 5 der Pentose.

Die Purinbasen Adenin und Guanin werden in allen Nukleinsäuren gefunden. Von den Pyrimidinbasen kommt Cytosin in allen Nukleinsäuren, Thymin nur in der DNS, Urazil nur in der RNS

Nukleinsäuren sind Polymere, die aus Ketten von Mononukleotiden bestehen, die untereinander mit Phospho-Diester-Bindungen verknüpft sind.

Allopurinol wurde als Hemmstoff für die Oxydation von 6-Mercaptopurin entwickelt. Schon bald ließ sich seine hemmende Wirkung auf die Harnsäurebildung erkennen Der Abfall der Serumharnsäure und der renalen Harnsäureausscheidung ist auf die Hemmung des Enzyms Xanthinoxydase zurückzuführen.

Fox und Mitarbeiter konnten 1970 zeigen (12), daß unter kontinuierlicher Gabe von Allopurinol die renale Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin zunahm. Diese Zunahme beruht auf der Hemmung des Enzyms Orotidyldekarboxylase, das die Umwandlung von Orotidin-5-Monophosphat zu Uridin-5-Monophosphat katalysiert.

Zöllner und Gröbner fanden 1971 (53), daß die orale Verabreichung von Ribonukleinsäure die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie deutlich herabsetzt.

Die vorliegende Arbeit zeigt den Einfluß von RNS-Hydrolysat, Adenin und Guanin auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie.

2. Pyrimidin- und Purinstoffwechsel

2.1. Pyrimidin-Stoffwechsel

2.1.1. Pyrimidin-Biosynthese de novo (Abb. 1)

Der erste Reaktionsschritt führt beim Menschen zum Carbamylphosphat. Katalysierendes Enzym dieser Reaktion ist die Carbamylphosphat-Synthetase, benötigte Substrate sind Adenosintriphosphat (ATP), Kohlendioxyd(CO_2), sowie Glutamin. Aus Carbamylphosphat entsteht unter Mitwirkung der Aspartat-Transcarbamylase Carbamylaspartat. Der Pyrimidinring wird dann durch die reversible Wasserabspaltung von Carbamylaspartat zu Dihydro-Orotsäure gebildet. Hierauf folgt die Dehydrierung zur Orotsäure. Katalysierende Enzyme der letzten beiden Schritte: Dihydro-Orotase und Dihydroorotsäure-Dehydrogenase. Aus Orotsäure entsteht durch Reaktion mit 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) das erste Pyrimidin-Nukleotid, nämlich Orotidin-5-Monophosphat (OMP). Dieser Reaktionsschritt wird durch das Enzym Orotat-Phosphoribosyltransferase katalysiert. OMP wird schließlich durch die Orotidyldekarboxylase (ODC) zu Uridin-5-Monophosphat (UMP) dekarboxyliert.

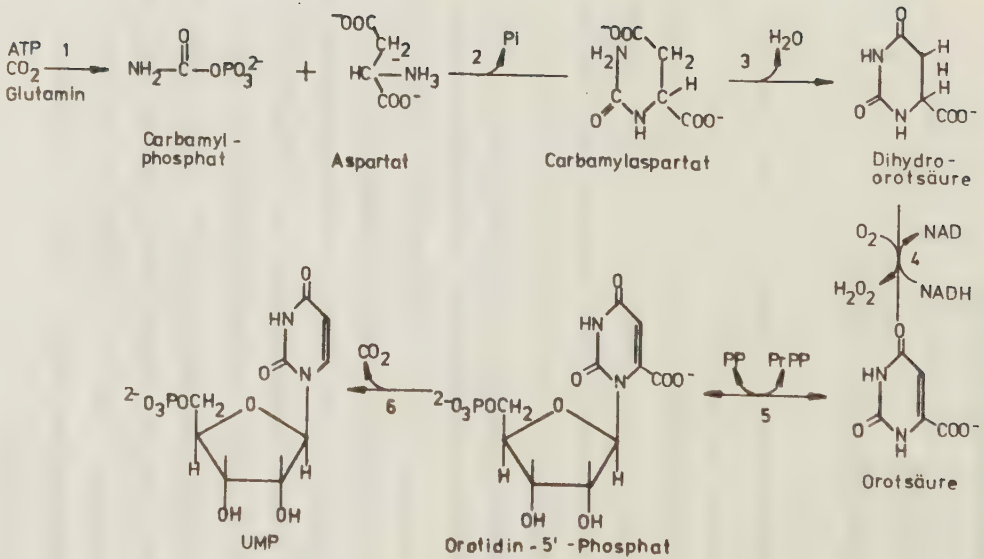

Abb.1: Pyrimidin-Biosynthese de novo

1: Carbamylphosphatsynthetase, 2: Aspartat-Transcarbamylase, 3: Dihydro-Orotase,
4: Dihydroorotsäure-Dehydrogenase, 5: Orotat-Phosphoribosyltransferase,
5: Orotidyldekarboxylase (25)

2.1.2. Umwandlung von Pyrimidin-Nukleotiden (Abb.2)

Die Pyrimidinribonukleosid-Monophosphate und Pyrimidindesoxyribonukleosid-Monophosphate können durch verschiedene Enzyme zu Di- und Tri-Phosphaten phosphoryliert werden. So wird z.B. UMP zu Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP) umgewandelt. Andererseits können UMP und Cytidin-Monophosphat (CMP) auch direkt aus Pyrimidinbasen und Nukleosiden entstehen.

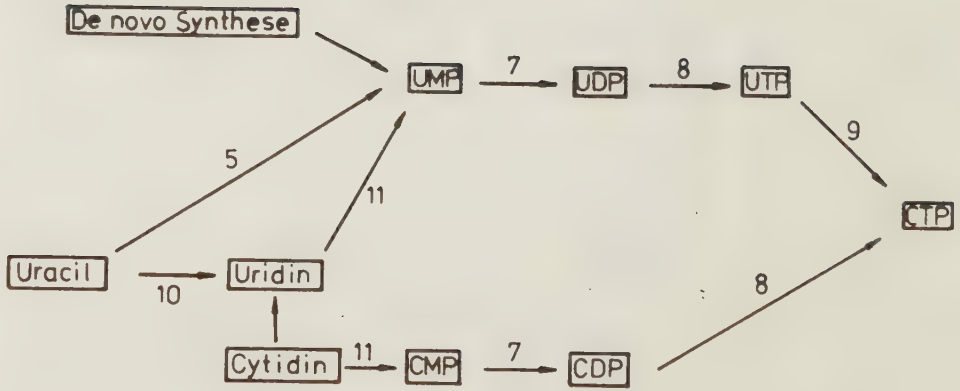

Abb.2: Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden

5: Uracil-Kinase, 7: CMP-Kinase, 8: Nukleosid-Diphosphat-Kinase, 10: Uridin-Phosphorylase, 11: Uridin-Kinase (16)

2.1.3. Abbau von Pyrimidinverbindungen (Abb.3)

Der Abbau der Pyrimidinverbindungen beginnt mit der Reduktion von Urazil bzw. Thymidin zu 5,6-Hydroxy-pyrimidinen. Anschließend werden diese Verbindungen hydrolysiert, es entstehen Carbamyl-ß-Alanin, Carbamyl-ß-Aminoisobutyrat, sowie CO_2, Ammoniak und ß-Alanin oder ß-Aminobutyrat.

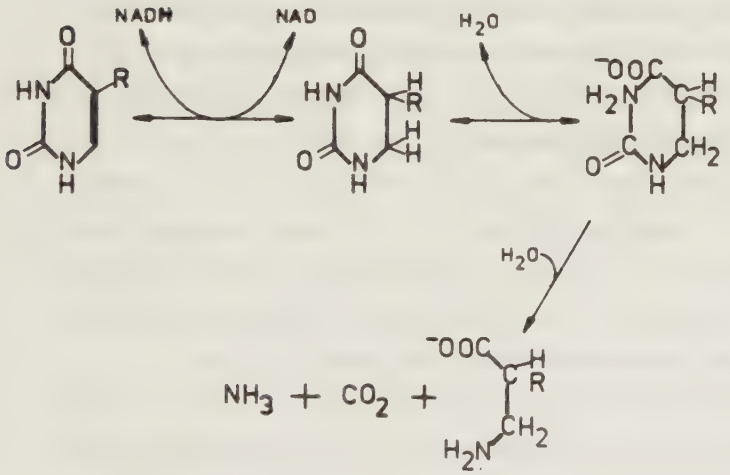

Abb.3: Abbau der Pyrimidine

2.1.4. Regulation der Pyrimidinsynthese

Die Regulation der Pyrimidinsynthese wurde ausgiebig an Bakterien untersucht. Bei Bakterien hemmen "Endprodukte" die Bildung der Enzyme, welche die ersten Schritte der Pyrimidinsynthese katalysieren (15, 43). Weniger Information liegt dagegen bezüglich des Säugetierorganismus vor, obwohl sichere Unterschiede bestehen (23). Eine ähnliche "Endprodukthemmung" gilt wahrscheinlich auch für den Pyrimidinstoffwechsel des Menschen. Möglicherweise ist die Carbamylphosphat-Synthetase das erste Enzym, über das die Pyrimidinsynthese zumindest teilweise reguliert werden kann. Weitere Kontrollmöglichkeiten betreffen die Enzyme Dihydro-Orotase bzw. Orotidyldekarboxylase, letztere wird durch UMP gehemmt.

2.1.5. Störungen des Pyrimidinstoffwechsels des Menschen

Hereditäre Orotazidurie (Typ I und II)

Die hereditäre Orotazidurie ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Pyrimidinstoffwechsels. Die Krankheit geht mit einer gegen Folsäure resistenten megaloblastären Anämie, Leukopenie, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung sowie einer exzessiven renalen Ausscheidung von Orotsäure (und Orotidin bei Typ II, siehe unten) einher (44). Als für die Orotsäureausscheidung verantwortlicher, molekularer Defekt ist der Ausfall der Aktivitäten von Orotat-phosphoribosyl-Transferase und Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase anzusehen (Schritte 5 und 6 in Abb.1). Das angestaute Substrat wird als Orotat (und dessen Ribosid bei Typ II) ausgeschieden. Die klinischen Erscheinungen dürften die Folge eines Mangels an Pyrimidinnukleotiden sein, die endogen nicht gebildet werden können. Trotz ihrer Seltenheit kann die Orotazidurie besonderes wissenschaftliches Interesse beanspruchen, da es sich um die bis jetzt einzige klar definierte Störung des menschlichen Pyrimidinstoffwechsels handelt und da bei der häufigeren Form, der hereditären Orotazidurie Typ I, ein zweifacher Enzymdefekt vorliegt. Als Ursache des Doppelenzymdefektes wird eine Regulator- oder Strukturgenmutation diskutiert. Zumindest in einem Fall von hereditärer Orotazidurie sprechen die Befunde

für eine Strukturgenmutation (45). Von den bisher beschriebenen Patienten mit hereditärer Orotazidurie wiesen mit einer Ausnahme alle eine ausgeprägte Verminderung der Orotat-phosphoribosyl-Transferase und Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase in den Erythrozyten auf. Bei dem Typ II der hereditären Orotazidurie (11) fehlte lediglich die Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase, während die Aktivität der Orotat-phosphoribosyl-Transferase anfangs sogar erhöht war. Nach zweijähriger Uridintherapie fiel bei diesem Patienten die Orotat-phosphoribosyl-Transferase-Aktivität auf 10 - 15%, nach dreijähriger Behandlung auf 2% des Normalwertes ab. Diese Beobachtung wird auf eine Endproduktrepression der Synthese von Orotat-phosphoribosyl-Transferase durch das aus Uridin gebildete UMP und UTP zurückgeführt (14).

Im Gegensatz zu den homozygoten Erbträgern der hereditären Orotazidurie Typ I weisen Heterozygote lediglich eine verminderte Aktivität beider Enzyme auf. Klinische Manifestationen werden bei heterozygoten Erbträgern nicht beobachtet.

Die Verabreichung von Uridin führt zu einer deutlichen Abnahme der renalen Orotsäureausscheidung sowie einer wesentlichen Besserung der klinischen Befunde. Absetzen der Uridinbehandlung geht mit Wiederauftreten der klinischen Manifestationen einher.

2.2. Purinstoffwechsel

2.2.1. Purinsynthese de novo

Die Biosynthese de novo des Puringerüstes ist eine schrittweise Synthese, die von Ribose-5-Phosphat ausgeht und durch sukzessive Anlagerung kleinster Molekülgruppen aus dem Aminosäure-Stoffwechsel zum Mononukleotid Inosin-5-Monophosphat führt (IMP) (Abb.4). Die Synthese von 5-Phosphoribosylamin (PRA) aus Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) und Glutamin stellt den ersten spezifischen Schritt der Purinsynthese dar. Diese Reaktion, die durch das Enzym Glutamin-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase katalysiert wird, ist irreversibel und für die gesamte de novo Purinsynthese geschwindigkeitsbestimmend.

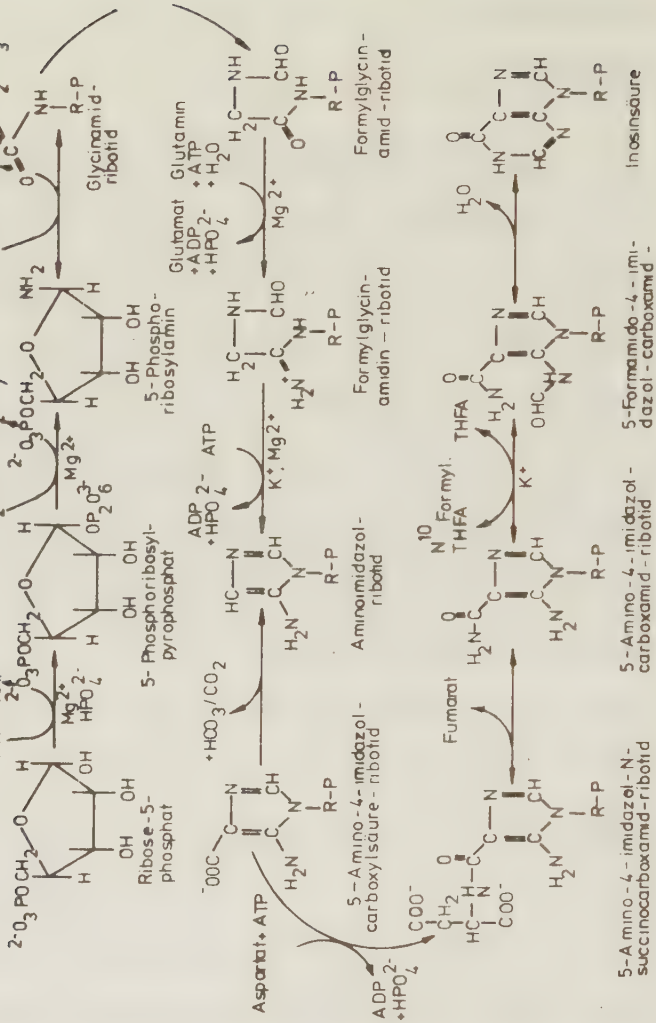

Abb.4: Biosynthese de novo der Inosinsäure (20)

Durch weitere Substitutionsreaktionen an den Kohlenstoffatomen 6 und 2 des IMP-Moleküles entstehen Adenosin- bzw. Guanosin-5-Monophosphat (AMP bzw. GMP) (Abb.5).

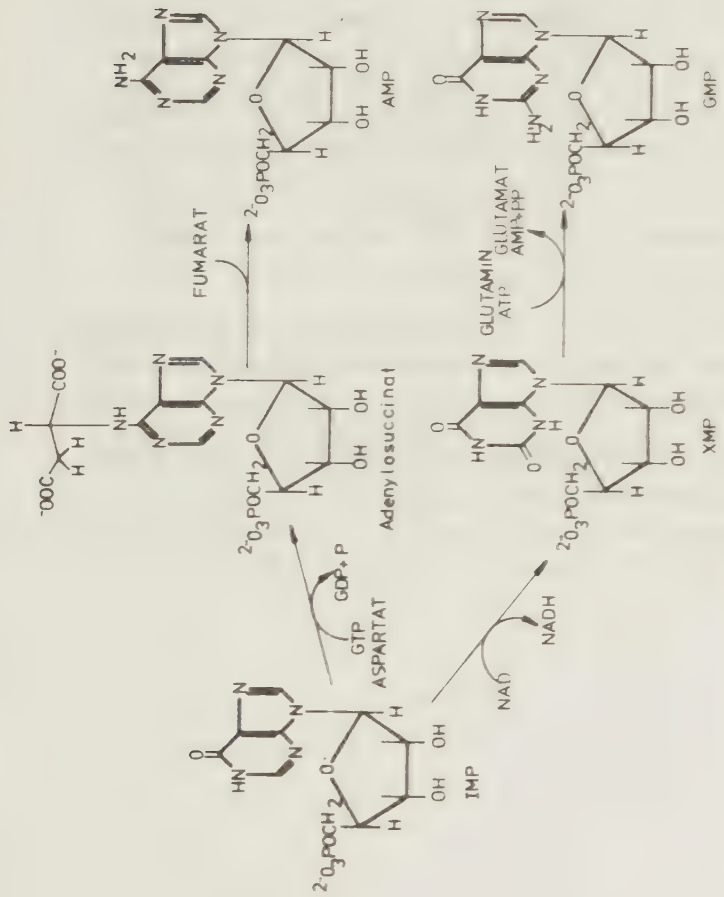

Abb.5: Biosynthese von AMP und GMP (20)

2.2.2. Abbau der Purine

Nukleotide werden durch Dephosphorylierung zunächst zu Nukleosiden abgebaut (Abb.6). 5-Nukleotidasen sowie alkalische und saure Phosphatasen hydrolisieren AMP, IMP, GMP und Xanthin-Monophosphat (XMP) zu Adenosin, Inosin, Xanthosin und Guanosin. Durch Purinnukleosid-Phosphorylase werden die drei zuletzt erwähnten Nukleoside dann zu den entsprechenden Basen abgebaut. Adenosin dagegen wird nicht oder nur zu einem kleinen Anteil direkt zu Adenin umgewandelt (10). In Säugetiergeweben erfolgt der Abbau von AMP und Adenosin hauptsächlich über die Bildung von IMP bzw. Inosin. Nach Entstehung der Basen Hypoxanthin aus AMP und IMP, Xanthin aus XMP und Guanin aus GMP wird Harnsäure gebildet. Guanin wird dabei durch eine Guanase zu Xanthin desaminiert. Hypoxanthin und Xanthin werden durch das Enzym Xanthin-Oxidase zu Harnsäure abgebaut.

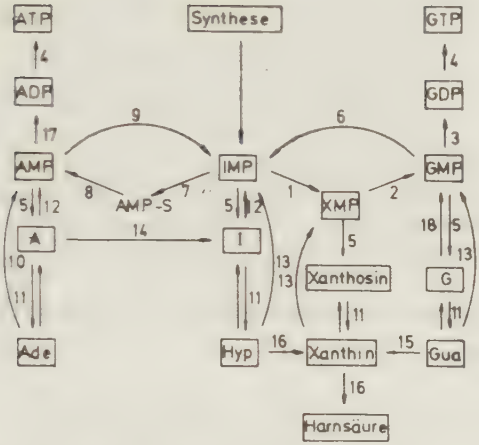

Abb.6: Umwandlung und Abbau von Purinen
1: IMP-Dehydrogenase, 2: XMP-Aminase, 3: GMP-Kinase, 4: Nukleosiddiphosphat-Kinase, 5: 5'-Nukleotidase, 6: GMP-Reduktase, 7: Adenylsuccinylsäure-Synthetase, 8: Adenylsuccinase, 9: AMP-Deaminase, 10: Adeninphosphoribosyltransferase, 11: Purinnukleosid-Phosphorylase, 12: Adenosinkinase, 13: Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase, 14: Adenosindeaminase, 15: Guanase, 16: Xanthinoxidase, 17: AMP-Kinase, 18: Guanosin-Kinase (25)

2.2.3. Die Regulation der Purinsynthese und ihre Störungen

Die Regulation der Purinsynthese wurde vor allem von Wyngaarden (46) untersucht. Er konnte zeigen, daß Adenyl-, Inosin- und Guanylsäure den ersten Schritt der Purinsynthese, nämlich die Aminierung von PRPP zu PRA hemmen. Andere Untersuchungen (22) zeigten, daß Kombinationen von 6-OH und 6-NH_2-Purinnukleotiden, z.B. IMP und GMP, die Enzymaktivität der menschlichen Glutamin-5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase synergistisch hemmen.

Dies spricht für zwei separate Bindungsstellen für diese Endprodukte am Enzym. Adenyl- und Guanylsäure hemmen nicht nur die Glutamin-5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase, sondern beeinflussen im Sinne eines Rückkoppelungeffektes auch ihre eigene Entstehung aus Inosinsäure (Abb.7). Darüber hinaus wird die intrazelluläre Konzentration von Adenyl-, Inosin- und Guanylsäure auch von der Aktivität der Hypoxanthin-guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) und Adenyl-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) beeinflußt. Man nimmt an, daß nach Produktion ausreichender Mengen dieser Nukleotide die Neusynthese dieser Purine im Sinne eines Feedback-Mechanismus von selbst gebremst wird.

Eine Störung der Purinsynthese kann also auf folgenden Ursachen beruhen:

- auf einer Konzentrationsänderung der Schlüsselsubstrate PRPP und Glutamin
- auf einer Änderung der Aktivität der Glutamin-5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase
- auf einer Änderung der intrazellulären Konzentrationen von Adenyl-, Inosin- und Guanylsäure.

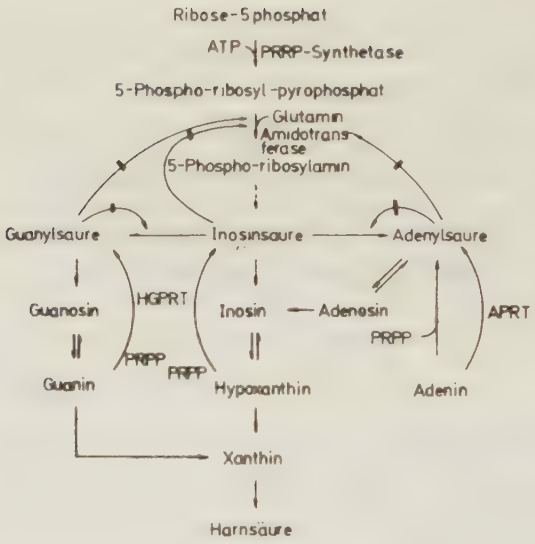

Abb.7: Schematische Darstellung des Purinstoffwechsels und seiner Regulation (19) nach (31)

Im Gegensatz zu Glutamin, dessen Rolle im Rahmen der Regulation der Purinsynthese noch weitgehend unbekannt ist, wurde die Bedeutung von PRPP für die Purinsynthese in den letzten Jahren deutlich erkannt. Die intrazelluläre Konzentration dieser Verbindung stellt das Resultat aus Synthese und Verbrauch dar (Abb.8). Bei einem Teil von Gichtpatienten mit vermehrter Harnsäuresynthese wurde eine erhöhte Produktion von PRPP gefunden (24). Weitere Untersuchungen (42) zeigten bei einem Gichtpatienten eine vermehrte Produktion von PRPP und Harnsäure sowie eine gesteigerte Aktivität der Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Synthetase, also des Enzyms, das die Bildung von PRPP aus Ribose-5-Phosphat und Adenosin-Triphosphat katalysiert (Abb.8). Dies läßt die Vermutung zu, daß eine Abnormalität der Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Synthetase zu einer gesteigerten Harnsäure-Synthese und auf diesem Wege zur Entwicklung der Gicht führt.

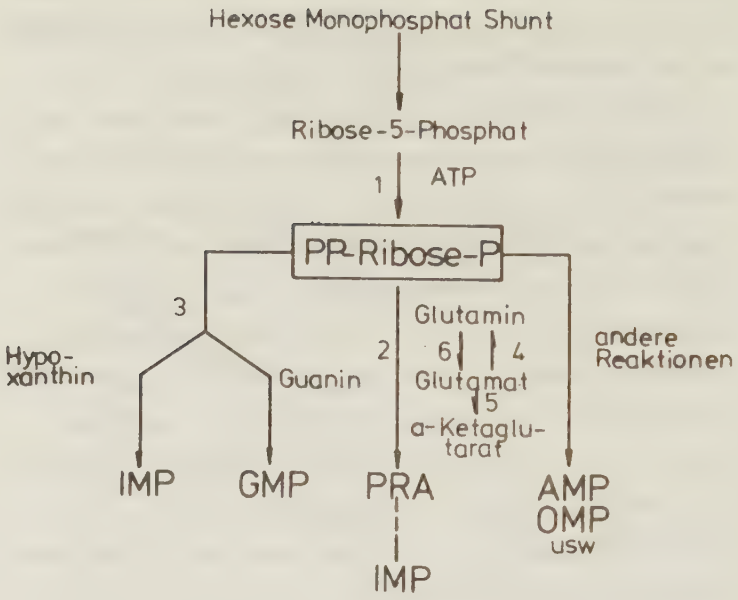

Abb.8: Die Stellung von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat innerhalb des Purinstoffwechsels

1: Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Synthetase, 2: Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase, 3: Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase, 4: Glutamin-Synthetase, 5: Glutamat-Dehydrogenase, 6: Glutaminase (28)

Eine erhöhte PRPP-Synthese und erhöhte PRPP Konzentration finden sich bei Gichtpatienten mit einer verminderten bzw. fehlenden Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase. Diese Patienten weisen eine kompensatorisch erhöhte Purin- (und Harnsäure-) Synthese auf, um die Purinverluste infolge fehlender Wiederverwertung auszugleichen. Der Mangel an Adenin-Phosphoribosyl-Transferase scheint dagegen zu keiner Änderung der intrazellulären Konzentration von PRPP zu führen. Dieser Enzymdefekt geht auch mit keiner veränderten Harnsäure-Synthese einher.

Das Lesch-Nyhan-Syndrom ist eine Erkrankung, die mit exzessiver Harnsäureproduktion einhergeht. Charakteristisch für dieses Syndrom sind eine an das X-Chromosom gebundene, rezessive Vererbung, die klinischen Zeichen der Gicht, sowie zentralnervöse und neurologische Störungen. Die auffallendste biochemische Abnormität stellt das Fehlen der Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase dar. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Hypoxanthin und Guanin zu ihren Nukleotiden (Abb.7). Guanyl- und Inosinsäure sind wiederum Feedback-Inhibitoren der Purinsynthese de novo. Die Störungen dieser Regulation

sowie eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von PRPP führen bei diesem Syndrom zu einer gesteigerten Harnsäure-Synthese. Andere Gichtpatienten mit vermehrter Harnsäure-Synthese wiesen einen partiellen Mangel an Aktivität der Hypoxanthinguaninphophoribosyl-Transferase auf (3). Neurologische Störungen wurden dabei nicht beobachtet.

3. Einfluß von Allopurinol auf Pyrimidin- und Purin-Stoffwechsel

Allopurinol wurde als Hemmstoff für die Oxydation von 6-Mercaptopurin entwickelt. Schon bald wurde seine hemmende Wirkung auf die Harnsäurebildung erkannt (41). Diese harnsäuresenkende Wirkung von Allopurinol konnte von zahlreichen Autoren bestätigt werden und führte zum Einsatz dieser Substanz bei der Behandlung der Gicht (6, 33, 40, 47, 48, 49, 51, 54).

3.1. Pharmakokinetik von Allopurinol

Allopurinol wird rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und ist im Plasma nach 30-60 Minuten nachweisbar. Weder Allopurinol noch sein Hauptmetabolit Oxypurinol sind an Plasmaprotein gebunden. Etwa 20% der oral verabreichten Dosis wird nach 48-72 Stunden in den Faeces gefunden. Allopurinol wird rasch metabolisiert. Die biologische Halbwertszeit beträgt nur 2-3 Stunden. Etwa 3-10% der Dosis werden unverändert im Urin ausgeschieden (7). Der größte Teil wird zu Oxipurinol oxydiert, ein kleiner Teil zu Allopurinolribonukleosid (34) und Allopurinolnukleotid (9)

umgewandelt. Oxipurinol wird zum größten Teil unverändert im Urin ausgeschieden, ein kleiner Teil wird zu Ribosiden und Ribotiden metabolisiert.

3.2. Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Allopurinol

Allopurinol hemmt das Enzym Xanthinoxydase. Dies führt sowohl zu einem Abfall der Serumharnsäure als auch zu einem Abfall der renalen Harnsäureausscheidung. Gleichzeitig steigt die Ausscheidung von Oxypurinen im Urin an. Bei den meisten Patienten wird aber die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung nicht durch die vermehrte Oxypurinelimination ersetzt (6,21,39,41,52).

Dies legt die Vermutung nahe, daß Allopurinol auch zu einer Beeinflussung der Purinsynthese de novo führt. Es konnte gezeigt werden (8), daß die Verminderung der Puringesamtausscheidung unter Allopurinol mit einem verminderten Einbau von markiertem Glycin in die Urinharnsäure verbunden ist. Untersuchungen am Menschen und mit Taubenleber ließen mehrere Mechanismen zur Erklärung der Hemmung der Purinsynthese beim Menschen durch Allopurinol annehmen (Abb.9):

1. Das Ribonukleotid des Allopurinol hemmt in vitro die 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase sowohl der Taubenleber als auch des Menschen (22,36). Dieses Enzym ist geschwindigkeitsbestimmend für die Purinsynthese de novo.

2. Allopurinol führt durch Hemmung der Xanthinoxydase zu einer vermehrten Bildung von Inosinsäure aus Hypoxanthin, Inosin-5-Monophosphat sowie die daraus entstehenden Adenin- und Guaninnukleotide sind allosterische Inhibitoren der 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Amidotransferase (4,22,28).

3. Nach oraler Einnahme von Allopurinol fiel innerhalb von 3-5 Stunden die Konzentration von PRPP in den Erythrozyten ab. Dieser Abfall wurde mit der Bildung von Allopurinolribonukleotid erklärt. Somit wäre vorstellbar, daß die vermehrte Umwandlung von Allopurinol oder Hypoxanthin zu den entsprechenden Ribonukleotiden zu einer Reduktion der intrazellulären Konzentration von PRPP und somit zu einer verminderten Purinsynthese de novo führt (9).

Wahrscheinlich läßt sich die Beeinflussung der Purinsynthese de novo während einer Allopurinol-Behandlung auf alle drei Mechanismen zurückführen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Enzym Hypoxanthinguanin-

phosphoribosyltransferase, das die Ribonukleotidbildung katalysiert. Bei Patienten mit verminderter Aktivität dieses Enzyms führt Allopurinol zu keiner Beeinflussung der Purinsynthese de novo (29).

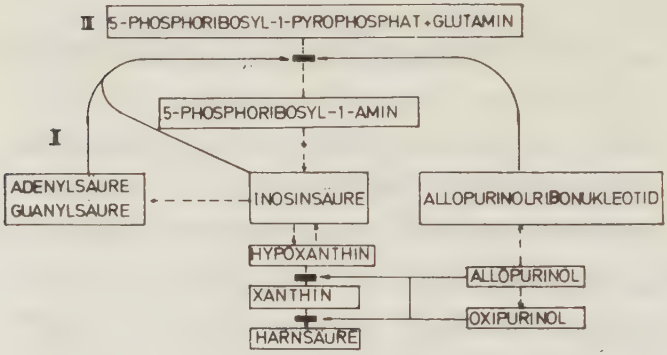

Abb.9: Mögliche Mechanismen der Hemmung der Purinsynthese de novo durch Allopurinol. Diese umfassen:

I: Umwandlung von Allopurinol zu Allopurinol-Ribonukleotid

II: Die vermehrte Bildung von Inosin-, Adenyl-, Guanylsäure aus Hypoxanthin

III: Die Verminderung von intrazellulärem 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat.

- - → Stoffwechselwege

——→ Hemmwirkung

▬ Ort der Hemmung (18) nach (28)

3.3. Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol

Unter Allopurinolbehandlung steigen die renale Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin an (12, 26, 30). Dieser Anstieg ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyldekarboxylase zurückzuführen, das die Umwandlung von Orotidin-5-Monophosphat zu Uridin-5-Monophosphat katalysiert (Abb.10).

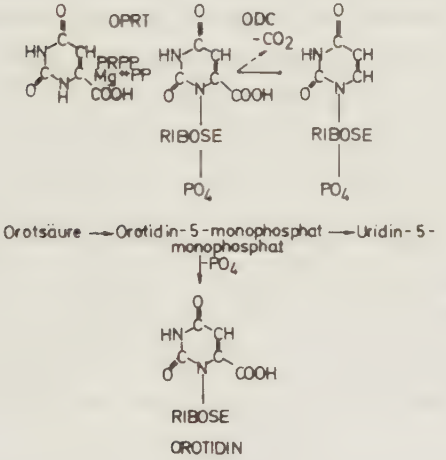

Abb.10: Umwandlung von Orotsäure zu Uridin-5-Monophosphat

OPRT: Orotatphosphoribosyltransferase
ODC: Orotidyldekarboxylase
PRPP: 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (18)

Diese Hemmung kommt zustande durch Allopurinolribonukleotid, Xanthin-5-Monophosphat sowie die beiden Ribonukleotid-Derivate des Oxipurinol, nämlich 1-Oxipurinolribonukleotid und 7-Oxipurinolribonukleotid. Dabei katalysiert das Enzym Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase die Synthese von 1-Oxipurinolribonukleotid aus Oxipurinol, die Orotatphosphoribosyltransferase die Bildung von 7-Oxipurinolribonukleotid.

Der Hemmung der Orotidyldekarboxylase folgt unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol innerhalb von ein bis zwei Wochen ein Anstieg der Aktivitäten von Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidyldekarboxylase (1,13). Eine Theorie nahm dabei eine Enzymstabilisierung beider Enzyme an (13), während die andere Theorie den Anstieg beider Enzymaktivitäten auf eine "Enzymaktivierung im weitesten Sinne" zurückführte (2). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Anstieg beider Enzymaktivitäten auf einer Enzymstabilisierung auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße beruht (17).

4. Problemstellung

Die kontinuierliche Gabe von Allopurinol führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin im Urin.

Zöllner und Gröbner konnten 1971 zeigen (53), daß die Gabe von Ribonukleinsäure zu einer Reduktion der durch Allopurinol induzierten Orotaziurie führt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die in der RNS enthaltenen Nukleotide Guanosin-5-Monophosphat, Uridin-5-Monophosphat und Cytosin-5-Monophosphat, in einer Dosis von ein Gramm pro Tag gegeben, zu einer Reduktion der durch Allopurinol induzierten renalen Orotsäureausscheidung führen. Ein Gramm Adenosin-5-Monophosphat übte dagegen keinen Effekt aus. Weitere Untersuchungen zeigten, daß auch Nukleoside (Uridin, Cytidin, Adenosin, Guanosin) sowie Hypoxanthin die durch Allopurinol hervorgerufene Orotsäureausscheidung vermindern.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob auch Ribonukleinsäure-Hydrolysat (4 g/Tag), sowie die Purinbasen Adenin und Guanin (je 3 g/Tag) unter standardisierten Ernährungsbedingungen die durch Allopurinol induzierte Orotsäureausscheidung im Urin ändern.

Gleichzeitig sollte der Einfluß dieser Substanzen auf die Enzymaktivitäten von Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase, Adeninphosphoribosyltransferase sowie Orotidyldekarboxylase untersucht werden.

5. METHODIK

5.1. DIÄTVERSUCH

5.1.1. VERSUCHSPERSONEN

Es wurden drei gesunde Versuchspersonen (Vp) ausgewählt:

- Vp "A" geb. 2.11.49 männlich
- Vp "B" geb. 12.12.48 männlich
- Vp "C" geb. 25.7.48 männlich

Der Gesundheitszustand wurde nach üblichen klinischen und Blutparametern geprüft:

	Vp "A"	Vp "B"	Vp "C"
Gesamt-Bilirubin	0,8 mg%	0,6 mg%	0,5 mg%
Harnstoff-N	10 mg%	11 mg%	10 mg%
Kreatinin	0,3 mg%	0,8 mg%	0,7 mg%
Natrium	143 mval/l	144 mval/l	143 mval/l
Kalium	4,2 mval/l	4,3 mval/l	4,1 mval/l
Calcium	9,1 mval/l	8,9 mval/l	8,8 mval/l
Harnsäure	6,2 mg%	5,0 mg%	4,95 mg%
GOT	11 I.E.	8 I.E.	7 I.E.
GPT	8 I.E.	9 I.E.	6 I.E.
Größe	181 cm	169 cm	174 cm
Gewicht	78 kg	63 kg	69 kg

5.1.2. Diät

Die drei Personen ernährten sich für die Dauer des Versuches (28 Tage) ausschließlich von einer isoenergetischen, purinfreien Formeldiät. Diese bestand aus Magermilchsprühpulver (MMSP), Maltodextrin (MD), Livio-Öl und Wasser. Der Diät wurden geringe Mengen NaCl hinzugegeben, Vitamine wurden durch Multibionta-Kapseln substituiert.

Prozentuale Zusammensetzung der Diät:

	Eiweiß	Kohlenhydrate	Fett
Diät	15%	55%	30%
MMSP	15%	21,37%	0,78%
MD	___	33,63%	___
Livio-Öl	___	___	29,22%

Somit ergab sich folgende prozentuale Zusammensetzung der Diät:

- Eiweiß kam zu 100% aus MMSP
- Kohlenhydrate kamen zu 38,85% aus MMSP, zu 61,15% aus MD
- Fett kam zu 2,62% aus MMSP, zu 97,38% aus Livio-Öl.

Die Ermittlung des energetischen Bedarfes der einzelnen Versuchspersonen ergab sich aus:

- Bestimmung der Körperoberfläche aus Gewicht und Größe
- Berechnung des Tagesgrundumsatzes mittels Körperoberfläche, Alter, Geschlecht und Tätigkeit.

Dies ergab folgende Zusammensetzung der Diät der einzelnen Versuchspersonen:

Vp "A"

Nährstoffquelle	in g	Nährstoffe	in g	kcal
MMSP	332,7	Eiweiß	109,8	450
(1113,6 kcal)		KH	156,3	641,1
		Fett	2,4	22,5
MD	258,3	Eiweiß	---	---
(1008,9 kcal)		KH	246	1008,9
		Fett	---	---
Livio-Öl	94,2	Eiweiß	---	---
(877,5 kcal)		KH	---	---
		Fett	89,4	877,5

Somit ergab sich für Versuchsperson A ein Tages-energiebedarf von 3000 kcal.

Vp "B" und Vp "C"

Nährstoffquelle	in g	Nährstoffe	in g	kcal
MMSP	277,3	Eiweiß	91,5	375
(928 kcal)		KH	103,3	534,3
		Fett	2,0	18,7
MD	215,3	Eiweiß	---	---
(840,7 kcal)		KH	205,0	840,7
		Fett	---	---
Livio-Öl	78,5	Eiweiß	---	---
(731,3 kcal)		KH	---	---
		Fett	74,0	731,3

Somit ergab sich für die Versuchspersonen "B" und "C" jeweils ein Tagesenergiebedarf von 2500 kcal. Unter Zufuhr dieser errechneten Energiemenge blieb das Körpergewicht der Versuchspersonen konstant. Die Diät wurde jeweils am Vorabend für den folgenden Tag zubereitet. Dabei wurden die Nährstoffe unter Zugabe von einem Liter Wasser und 2 g NaCl (bei Vp"A"), bzw. 1,5 g NaCl (bei Vp "B" und Vp "C") mit einem Handmixer gründlich vermengt und in vier gleiche Einzelportionen in Plastikbehälter verpackt.

5.1.3. Versuchssubstanzen

Die Diät wurde, wie oben beschrieben, in vier Einzelportionen, gleichmäßig über den Tag verteilt, gegeben. Auch die Versuchssubstanzen wurden nach diesem Schema verabreicht.

Jede Versuchsperson bekam 400 mg Allopurinol pro Tag. Allopurinol lag in Tablettenform à 100 mg vor (Zyloric). Es wurden somit vier dieser Tabletten am Tag, zusammen mit der Diät, eingenommen.

Ribonukleinsäure-Hydrolysat, sowie die Nukleotide Adenin und Guanin lagen in kristalliner Form vor. Ribonukleinsäure-Hydrolysat wurde vier g pro Tag gegeben, Adenin und Guanin je drei g pro Tag, und zwar ebenfalls in vier gleichen Einzelportionen jeweils zu der Diät. Dazu wurden mit einer Analysenwaage Einzelportionen von je ein g Ribonukleinsäure-Hydrolysat bzw. Einzelportionen von je 0,750 g Adenin und Guanin abgewogen und in kleine Oblaten-Behälter eingebracht.

5.1.4. Versuchsablauf

Die drei Versuchspersonen nahmen 28 Tage lang die für sie berechnete isoenergetische Diät zusammen mit den für sie vorgesehenen Versuchssubstanzen ein. Ein Tagesprotokoll wurde von jeder Person geführt, in das der Gewichtsverlauf sowie die tägliche Flüssigkeitszufuhr und eventuell auftretende somatische Alterationen niedergeschrieben wurden. Der 24-Std.-Urin wurde täglich gesammelt, jeden zweiten Tag erfolgte die Abnahme von ca. 10 ml venösen Blutes. Die Flüssigkeitszufuhr wurde auf 1,5 l pro Tag festgelegt. Dabei durfte nur Mineralwasser, ungesüßter Tee bzw. Kaffee getrunken werden. Andere flüssige oder feste Nahrungsmittel waren verboten.

Die Diät sowie die Versuchssubstanzen wurden gut vertragen. Unverträglichkeitsreaktionen traten nicht auf; Diätfehler wurden nicht begangen, das Sammeln des 24-Std.-Urines wurde korrekt durchgeführt. Lediglich der eigenwillige Geschmack der Diät wurde anfangs als leicht störend empfunden.

Den zeitlichen Ablauf des Versuches zeigt Abb. 11

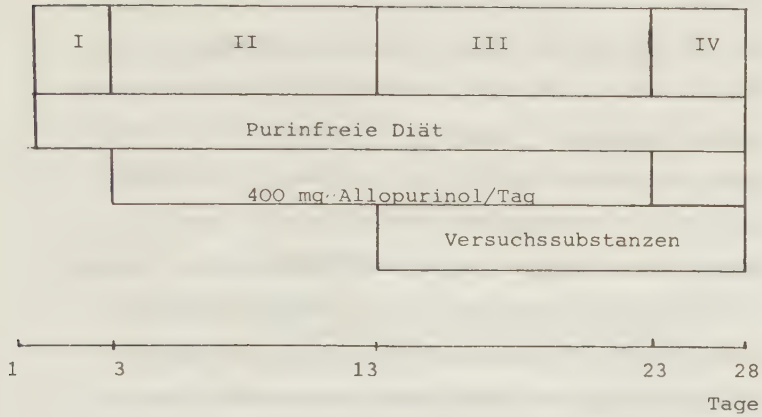

Abb.11: zeitlicher Ablauf des Versuches

Demnach ließ sich der Ablauf in vier Zeit-Perioden einteilen:

- Periode I: 1. mit 3. Tag: alleinige Gabe der Diät
- Periode II: 4. mit 13. Tag: Gabe von Formeldiät und Allopurinol
- Periode III: 14. mit 23. Tag: Gabe von Diät, Allopurinol, dazu Purin-Base bzw. Ribonukleinsäure-Hydrolysat
- Periode IV: 24. mit 28. Tag: Gabe von Diät, Purin-Base bzw. Ribonukleinsäure-Hydrolysat

Während der 28-tägigen Versuchsdauer wurde also die Diät in allen vier Perioden, Allopurinol während

Periode II und III, Ribonukleinsäure-Hydrolysat bzw. Adenin bzw. Guanin in den Perioden III und IV verabreicht.

Von den Blutproben wurde zunächst das Serum von den Blutzellen getrennt. Dazu wurde jede Probe in ein heparinisiertes (Thrombophob 2 Tropfen) Plastikreagenzglas gebracht und 20 min. bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Sorwall-Zentrifuge). Anschließend Abpipettierung des überstehenden Serums und Einfrieren desselben (Pasteur-Pipette). Nun wurden die Erythrozyten mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; nach neuerlichem Zentrifugieren und Abpipettieren, wie oben geschildert, wurden die Erythrozyten zur Lysierung zweimal eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde ein Dialysat hergestellt: Eine Dialyse-Membran wurde in 500 ml Muldestor in einem Erlmeyer-Kolben eine Stunde lang gekocht. Zur Abbindung der Schwermetallionen gab man 1,5 ml EDTA 0,2 M dazu. Nun wurde in einen zweiten Erlmeyer-Kolben 1 ml TRIS-Puffer 0,01 M ad ein Liter Muldestor aufgefüllt. Die Erythrozyten gab man jetzt in die vorbereitete Dialyse-Membran, brachte anschliessend diese in den zweiten Erlmeyer-Kolben ein. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden in einer Kältekammer bei 4° Celsius belassen.

5.2. Bestimmungsmethoden

Es werden folgende Bestimmungen durchgeführt:

- aus Urin:
  - Harnsäure
  - Kreatinin
  - Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin)
  - Orotsäure
- aus Serum:
  - Harnsäure
- aus Erythrozyten:
  - Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase
  - Adeninphosphoribosyltransferase
  - Orotidyldekarboxylase
  - Eiweiß

Der 24-Std.-Urin der Versuchspersonen wurde in Plastikgefäßen von ca. einem Liter Fassungsvermögen gesammelt, 10 ml Toluol wurde zugegeben, um Bakterienwachstum zu verhindern. Nach Messung der 24-Std.-Urinmenge wurden Urinmengen von jeweils etwa 10 ml in Glasfläschchen gefüllt und eingefroren. Vor jeder Analyse erfolgte das Auftauen des Urins im Wasserbad bei 37° Celsius und eine Filtration.

5.2.1. Bestimmung der Harnsäure in Serum und Urin

Die Bestimmung der Harnsäure wurde in der Modifikation nach Zöllner der Methode Praetorius und Poulsen durchgeführt (37,50).

- Prinzip:

  Harnsaure wird durch Einwirkung des Enzyms Uricase in Allantoin umgewandelt. Dabei verschwindet die für Harnsäure typische Absorptionsbande bei 293 nm. Dieser Extinktionsabfall beträgt bei Verwendung des angegebenen Glycin-Puffers 0,0745 für eine Harnsäurekonzentration von 1ug/ml und eine Schichtdicke von 1cm.

Benötigte Reagentien:

- Glycin-Puffer, 0,66M, pH 9,3
- Uricase "Loewens"
- Aqua bidest.
- Harnsäure "Merck"

- Durchführung:

  Zunächst wird eine Glycin-Puffer-Gebrauchslösung pH 9,3 hergestellt. Dazu verdünnt man die Glycin-Puffer-Stammlösung jeweils 1:10 mit aqua bidest. Anschließend erfolgt die Herstellung der Uricase-Gebrauchslösung:

  Der Inhalt einer Uricase-Ampulle wird zunächst in 0,25ml Glycin-Puffer-Gebrauchslösung aufgelöst.

Vor jeder Analyse wird eine entsprechende Menge dieser Lösung 1:100 mit Puffer-Gebrauchslösung verdünnt.
Das Serum wird 1:25 mit Puffer-Gebrauchslösung, der Urin 1:125 mit dieser Lösung verdünnt.
Zur Photometrie (Beckman-Photometer) werden folgende Ansätze fertiggestellt:

- zur Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase:
  Ansatz I)1): 2ml Puffer-Gebrauchslösung mit 1ml Uricase-Gebrauchslösung
  Ansatz I)2): 3ml Puffer-Gebrauchslösung
- zur Bestimmung des Extinktionsabfalles in Serum und Urin:
  Ansatz II)1): 2ml Serum- bzw. Urinverdünnung mit 1ml Puffer-Gebrauchslösung
  Ansatz II)2): 2ml Serum- bzw. Urinverdünnung mit 1ml Uricase-Gebrauchslösung.

Diese Ansätze werden 20min. bei Zimmertemperatur inkubiert.
Die Photometrie wird bei 293nm durchgeführt. Zur Bestimmung der Eigenextinktion der Uricase liest man Ansatz I)1) gegen Ansatz I)2) als Nullwert ab. Bei den Serum- bzw. Urinansätzen ist Ansatz II)2) Nullwert gegen Ansatz II)1). Die Ablesung der Ansätze am Photometer wird nach 5min. wiederholt, um sicherzustellen, daß die Uricase-Reaktion abgelaufen ist. Die Extinktion darf sich in diesem Zeitraum nicht geändert haben.

-Berechnung:

Harnsäure im Serum (mg%) = (E (U) + E (HS)) .50
Harnsäure im Urin (mg%) = (E (U) + E (HS)) .250

E(U): Eigenextinktion der Uricase

E(HS): Extinktion der Harnsäure

5.2.2. Bestimmung von Kreatinin im Urin

Zur Bestimmung des Kreatinins im Urin wurde die "Biochemika-Testkombination-Kreatinin" von Boehringer Mannheim verwendet.

- Prinzip:

Kreatinin reduziert eine alkalische Pikrinsäurelösung zu Pikrinsäure und Pikraminsäure, wobei ein gelb- bis braunroter Farbkomplex auftritt, dessen Intensität der Kreatinin-Konzentration proportional ist, und der spektralphotometrisch bei 520nm sein Absorptionsmaximum besitzt.

Benötigte Reagentien:

- Kreatinin "Merck"
- 35mM Pikrinsäure (Lösung I)
- 1,6n NaOH
- Trichloressigsäure, 1,2n (Lösung II)
- 17,5mM Pikrinsäure + 0,8n NaOH (Lösung III)

Der Analysen-Urin wird 1:50 mit aqua bidest verdünnt.

Es werden folgende drei Ansätze pipettiert:

	Ansatz I Leerwert	Ansatz II Standard	Ansatz III Urin
Aqua bidest.	0,5ml	---	---
Lösung I	---	0,5ml	---
Lösung II	0,5ml	0,5ml	0,5ml
1:50 verd. Urin	---	---	0,5ml
Lösung III	1,0ml	1,0ml	1,0ml

Die Ansätze werden 20min. bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend Messung der Extinktionen der Ansätze II und III jeweils gegen Ansatz I.

- Berechnung:

Kreatinin-Konzentration in mg% =

$$\frac{\text{Extinktion Ansatz III}}{\text{Extinktion Ansatz II}} \cdot 50$$

5.2.3. Bestimmung der Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin im Urin

Die Bestimmung der Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin im Urin wurde nach der Methode von Klinenberg und Mitarb. durchgeführt (32).

- Prinzip:

  Die Oxypurine werden indirekt gemessen. Sie werden durch das Enzym Xanthinoxydase zu Harnsäure umgewandelt. Harnsäure wird durch das Enzym Uricase zu Allantoin abgebaut. Dieser Abbau kann spektralphotometrisch bei 293nm gemessen werden.

Benötigte Reagentien:

- Hypoxanthin "Serva"
- 0,66M Glycin-Puffer pH 9,3
- Uricase "Loewens"
- Xanthinoxydase "Boehringer"

Die Zubereitung einer Glycin-Puffer-Stammlösung erfolgt durch Verdünnung 1:10 des 0,66M Glycinpuffers pH 9,3 mit aqua bidest.

Die Uricase-Gebrauchslösung wird zubereitet, indem man eine Ampulle Uricase in 1ml Glycin-Puffer-Stammlösung auflöst.

Der zu analysierende Urin wird 1:50 mit Glycin-Puffer-Stammlösung verdünnt.

Nun werden folgende Ansätze der Reihe nach pipettiert:

Ansatz	Puffer	Urin	Xanthinoxydase	Uricase (jeweils in ml)
1	3	-	-0,02	-
2	3	-	---	0,05
3	3	-	0,02	0,05
A	2	1	---	---
B	2	1	0,02	---
C	2	1	---	0,05
D	2	1	0,02	0,05

Die Extinktionen dieser Ansätze werden der Reihe nach bei 293nm gemessen.

-Berechnung:

Die Extinktionsdifferenz der Extinktionen der Ansätze B und D (B-D) entspricht der Extinktion der Gesamt-Harnsäure.

Die Extinktionsdifferenz der Extinktionen der Ansätze A und C (A-C) entspricht der Extinktion der Urin-Harnsäure.

Die Differenz dieser obigen Differenzen entspricht der aus den Oxypurinen stammenden Harnsäure:

$$E = (B-D) - (A-C)$$

Zur Oxypurin-Berechnung können die Eigenextinktionen der Enzyme Xanthinoxydase und Uricase vernachlässigt werden, da sie sich rechnerisch aufheben.

Menge der Oxypurine im 24-Std.-Urin in mg/die:

$$= \frac{E}{0,0745} \cdot 3,07 \cdot 50 \cdot 0,81 \cdot \text{24-Std.-Urinmenge}$$

5.2.4. Bestimmung der Orotsäure im Urin

Die Bestimmung der Orotsäure im Urin wurde nach der Methode von Rogers und Porter durchgeführt (38).

- Prinzip:

  Orotsäure reagiert mit gesättigtem Bromwasser zu 5-dibrombarbitursäure. Diese wird durch Ascorbinsäure zu Barbitursäure reduziert. Barbitursäure bildet mit Ehrlich-Reagenz (para-dimethylamino-Benzaldehyd) einen gelben Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 480nm liegt, und der Orotsäure-Konzentration proportional ist. Zu berücksichtigen ist, daß andere Urinsubstanzen Farbkomplexe bilden, die ein Absorptionsmaximum bei 412nm haben, aber auch im Absorptionsmaximum der Orotsäure ein "Plateau" bilden, das mit der Orotsäure-Extinktion interferiert, und somit eine verfälschte Orotsäure-Menge ergibt. Um diese Interferenz auszuschalten, wird in Testreihen ein Erfahrungswert gefunden, der als Korrekturfaktor in die Berechnung eingeht und die tatsächliche Orotsäure-Menge angibt:

$$E = E(480) - E(412)/3$$

Benötigte Reagentien:

- Orotsäure "Serva"
- K-Zitratpuffer (0,2M, pH 2,5)
- Ascorbinsäure 5% in Puffer gelöst
- Ehrlich-Reagenz 2,5%
- Bromwasser, gesättigt

Die Analyse wird bei Zimmertemperatur durchgeführt, die Proben gegen folgenden Leerwert gemessen:

- 3ml K-Zitratpuffer +
- 0,5ml Bromwasser +
- 1ml Ascorbinsäure +
- 2ml Ehrlich-Reagenz

In die Zentrifugengläser werden der Reihe nach pipettiert:

- 0,5ml Urin bzw. Orotsäure-Eichlösung
- 2,5ml K-Zitratpuffer
- 0,5ml Bromwasser
- 1,0ml Ascorbinsäure
- 2,0ml Ehrlich-Reagenz

Nach 90min. werden die Proben am Photometer bei 480nm und 412nm gegen den Leerwert abgelesen.

- Berechnung:

  Mit der errechneten Extinktion E, wie oben geschildert, wird in die Eichkurve eingegangen, und auf der Abszisse der Wert der Orotsäuremenge in gamma erhalten (X). Die Menge der Orotsäure im 24-Std.-Urin der untersuchten Urinprobe in mg ergibt sich aus:

  $$X \cdot 2 \cdot \text{24-Std.-Urinvolumen}.$$

5.2.5. Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms Orotidyldekarboxylase in Erythrozyten

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Orotidyldekarboxylase (ODC) wurde nach der Methode von Kelley und Beardmore (27) durchgeführt.

- Prinzip:
  Orotidin-5-Monophosphat (OMP) wird durch die ODC in Uridin-5-Monophosphat (UMP) umgewandelt. Dabei wird pro umgewandeltes Molekül OMP ein Molekül CO_2 freigesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Perchlorsäure gestoppt, wodurch gleichzeitig CO_2 ausgetrieben wird. Bei dieser Methode wird radioaktiv markiertes OMP-7-C-14 im Überschuß zugegeben. Das radioaktiv markierte Kohlenstoffatom wird als CO_2 frei. Dieses entstehende Produkt wird aufgefangen, indem man es an Hyamin-Hydroxyd bindet, und anschließend die Aktivität in counts/min. im Packard-Szintillationszähler gemessen. Die gemessene Aktivität ist der spezifischen Aktivität der ODC proportional.

Benötigte Reagentien:

- OMP-C-14 (NEN), liegt als 0,52 mM Stammlösung vor
- 0,01M K-Phosphatpuffer, pH 7,4
- Hyamin-Hydroxyd
- 4,0M Perchlorsäure
- Szintillationsflüssigkeit (bestehend aus 4l Toluol, 15,12g PPO, 312,4mg POPOP)

- Durchführung:

Die vorliegende OMP-7-C-14-Lösung wird mit dem K-Phosphatpuffer 1:10 verdünnt, die spezifische Aktivität beträgt 39,3 uCi/umol. Das Hämolysat wird 1:10 mit dem gleichen Puffer verdünnt. Je 50ul dieser Verdünnungen pipettiert man in ein Reagenzglas und verschließt dieses sofort luftdicht mit einem Gummistopfen, damit kein CO_2 entweichen kann. An der Unterseite dieses Gummistopfens ist ein Plastikkölbchen befestigt, das 0,2ml Hyamin-Hydroxyd enthält. Hierin wird das freiwerdende markierte CO_2 aufgefangen und gebunden. Diese Reaktion läuft 15min. im Schüttelinkubator bei 37° C ab. Danach bringt man die Probe ins Eisbad (4° C) und stoppt die Reaktion durch Injektion von 0,1ml Perchlorsäure durch den Gummistopfen. Danach wird der Ansatz bei 37° C eine Stunde inkubiert, der Inhalt der Kölbchen in Szintillationsgläschen gegeben, die je 10ml Szintillationsflüssigkeit enthalten. Die Zählung der Aktivität in counts/min. der Proben kann nun am Packard-Szintillationszähler durchgeführt werden.

- Berechnung:

Die Berechnung der spezifischen Aktivität der ODC in nmol/mg Protein/Std. wird an einem Beispiel gezeigt:

$1\ uCi \triangleq 2,22 \cdot 10^6$ dpm

$1\ umol\ OMP\text{-}C^{14} \triangleq 39,3\ uCi$

$1\ umol \triangleq 2,22 \cdot 10^6 \cdot 0,8 \cdot 39,3$ counts/min.

$\triangleq 69,69 \cdot 10^6$ cpm

(0,8 : Effizienzfaktor der Radioaktivitätsmessung)

$x\ umol \triangleq 890$ counts (beliebige Probe)

$x = (12,8 \cdot 10^{-3}\ nmol) \cdot 4 = 0,051$ nmol/h.

(Inkubationszeit : 15 min.)

$494,58\ \gamma \triangleq 0,051$ nmol/h.

(494,58 γ in die Eiweißmenge der Probe in 50 ul (Lowry))

$1000\ \gamma \triangleq 0,103$ nmol/mg Prot./h.

Die spezifische Aktivität der ODC dieser Hämolysat-Proben beträgt 0,103 nmol/mg Prot./h.

5.2.6. Bestimmung der Aktivität des Enzyms Hypoxanthinguanin-phosphoribosyltransferase aus Erythrozyten

Die Bestimmung wurde nach der Methode von Chow und Mitarbeitern (5) durchgeführt.

- Prinzip:

  Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) katalysiert unter Zugabe von Magnesium-Ionen und 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) die Reaktionen Guanin zu Guanosin-5-Monophosphat, sowie Hypoxanthin zu Inosin-5-Monophosphat (IMP). Die Reaktion wird unter Zuhilfenahme von radioaktiv markiertem Hypoxanthin-C-14 durchgeführt. Die Trennung von markiertem Hypoxanthin und in der Reaktion aus ihm entstandenem IMP-C-14 wird mittels Hochspannungselektrophorese erreicht.

Benötigte Reagentien und Ansätze:

- Lösung I : 0,1M MgCl (1 Teil)
  0,5M Tris-HCl, pH 7,4 (2 Teile)
  Aqua bidest. (2 Teile)
- Lösung II : 10mM PRPP
- Lösung III: Markiertes Hypoxanthin-C-14:
  Die Hypoxanthin-C-14-Lösung ist 2mM und weist eine spezifische Aktivität von 54,8mCi/mmol auf. Sie wird 1:10 mit äquimolarer unmarkierter Hypoxanthin-Lösung verdünnt. Die spez. Akt. dieser Verdünnung beträgt also 5,48mCi/mmol.

- Durchführung:

Zunächst wird aus den angegebenen Lösungen eine Standard-Substratlösung hergestellt:

- 5 Teile Lösung I (Menge 25ul)
- 2 Teile Lösung II (Menge 10ul)
- 3 Teile Lösung III (Menge 15ul)

Anschließend erfolgt die Verdünnung des Hämolysats 1:50: 50ul Hämolysat + 2,45ml Tris-HCl. Die Reaktion läuft bei $+4^{\circ}$ c ab, die Reagenzgläser stehen dazu in Eiswasser. 50ul der Hämolysat-Verdünnung werden mit 50ul Substratlösung in Reagenzgläser pipettiert. Der Leerwert ergibt sich aus dem Ansatz: 50ul Tris-HCl + 50ul Substratlösung. Der Ansatz wird 20min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert, und danach die Reaktion durch Zugabe von 20ul 0,1M EDTA gestoppt (EDTA bindet die Mg-Ionen ab).

Zur Durchführung der Elektrophorese wird Elektrophoresepapier Nr. 2049b in Stücke von 102cm Länge geschnitten und in 0,01M Borat-Puffer pH 6,66 getränkt. Auf der Startlinie der Elektrophorese wird 20ul IMP aufgetragen. Nachdem das Papier getrocknet ist, gibt man auf die Trägersubstanz jeweils 20ul der zu analysierenden Ansätze. Die Elektrophorese läuft 20min. bei 4000 Volt Spannung. Nach diesem Arbeitsvorgang wird das Papier der Elektrophoresekammer entnommen, und diezur Anode gewanderte IMP-C-14-Bande ausgeschnitten,

nachdem sie durch Betrachtung mit UV-Licht sichtbar gemacht worden ist. Anschließend bringt man diese Bande in Szintillationsgläschen, die jeweils mit 10ml Szintillationsflüssigkeit gefüllt sind (dieselbe wie bei der ODC-Bestimmung). Die Aktivität der zu untersuchenden Proben kann im Packard-Szintillationszähler in counts/min. abgelesen werden.

- Berechnung:

Die Berechnung wird an einem Beispiel dargelegt:

$$1\ \text{uCi} \triangleq 2{,}22 \cdot 10^6\ \text{dpm}$$

$$1\ \text{umol HX-C}^{14} \triangleq 50{,}4\ \text{uCi}$$

$$1\ \text{umol} \triangleq 2{,}22 \cdot 10^6 \cdot 0{,}6 \cdot 50{,}4\ \text{counts/min.}$$

(0,6 entspricht der Effizienz der Radioaktivitätsmessung)

$$1\ \text{umol} \triangleq 151{,}05 \cdot 10^6\ \text{cpm}$$

$$x = \left(\frac{12089}{151{,}05 \cdot 10^6} = 80 \cdot 10^6\ \text{umol/20min.}\right) \cdot 3 = 240 \cdot 10^{-3}\ \text{nmol/h.}$$

Protein (Lowry) : $(5\gamma/\lambda) \cdot 50 = 250\gamma$ in 120λ

In 20λ (ELFO-Ansatz) : $\frac{250 \cdot 20}{120} = 41{,}6\gamma$

$$41{,}6\gamma \triangleq 240 \cdot 10^{-3}\ \text{nmol/h.}$$

$$1000\gamma \triangleq \frac{240}{41{,}6} = 12{,}9\ \text{im 1:10 verdünnten Isotop}$$

HGPRT-Aktivität: 129 nmol/mg Prot./h.

5.2.7. Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms Adeninphosphoribosyltransferase aus Erythrozyten

- Prinzip:
  Adeninphosphoribosyltransferase (APRT) katalysiert unter Zugabe von Magnesium-Ionen und PRPP die Reaktion Adenin zu Adenosin-5-Monophosphat (AMP). Die Reaktion wird unter Zuhilfenahme von radioaktiv markiertem Adenin-C-14 durchgeführt.
- Durchführung und Berechnung verlaufen analog der HGPRT-Bestimmung 5.2.6., als Transportsubstanz bei der Elektrophorese wird AMP statt IMP verwendet.

DIE MIKRORADIOCHEMISCHEN BESTIMMUNGEN DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER ENZYME HGPRT, APRT SOWIE ODC WAREN LINEAR IN BEZIEHUNG AUF PROTEIN-KONZENTRATION UND ZEIT.

5.2.8. Bestimmung der Eiweiß-Konzentration in Erythrozyten

Diese Methode wurde nach Lowry (35) durchgeführt.

- Prinzip:

  Eiweiß geht in alkalischem Medium mit Kupfer-Ionen eine Biuret-Reaktion ein; das heißt, es bildet einen Farbkomplex, der bei 498nm maximal absorbiert.

- Benötigte Reagentien:

  - 2,0% Natriumkarbonat-Lösung in 0,1n NaOH
  - 0,5% Kupfersulfat $5H_2O$ in 1%K-Na-Tartrat
  - daraus Reaktionsgemisch: 1ml Cu-Sulfat- + Na-Karbonat-Lösung
  - Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (1:1)
  - Physiologische NaCl-Lösung
  - 100mg% Rinderserumalbuminlösung (Standard)

- Durchführung:

  Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der ODC wird das Hämolysat mit 0,01M K-Phosphatpuffer pH 7,4 1:20 verdünnt und hiervon 10ul ad 0,2ml mit physiol. NaCl-Lösung aufgefüllt. Zur Bestimmung der spez. Akt. der HGPRT bzw. APRT wird das Hämolysat mit dem Puffer 1:50 verdünnt und zur Eiweißbestimmung 20ul davon ad 0,2ml mit physiol. NaCl-Lösung aufgefüllt.
  Zu den Proben bzw. Eichlösungen gibt man 2ml Reaktionsgemisch und inkubiert den Ansatz 10min. bei Zimmertemperatur. Danach erfolgt das Stoppen der Reak-

tion durch Zugabe von 0,2ml Folin-Ciocalteus-Phenol-wasser. Nach weiteren 30min. wird die Extinktion am Photometer abgelesen.

- Berechnung:
  Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung wird aus der Eichkurve die der jeweiligen Extinktion entsprechende Eiweiß-Konzentration entnommen.

6. Ergebnisse

6.1. Versuchsperson "A"

(4g RNS-Hydrolysat pro Tag in Periode III und IV)

Der Mittelwert der renalen Harnsäure-Ausscheidung (Abb. 12):

- betrug in Periode I 370mg/die
- fiel in Periode II auf 280mg/die ab
- stieg in Periode III auf 430mg/die an (54% gegenüber Periode II)

In Periode IV stieg die renale Harnsäure-Ausscheidung wieder an. Ein Mittelwert konnte nicht bestimmt werden, da kein steady state bestand.

Der Mittelwert der renalen Oxypurin-Ausscheidung (Abb.13):

- betrug in Periode I 16,9mg/die
- stieg in Periode II auf 85,7mg/die
- stieg in Periode III auf 235,5mg/die an (175% gegenüber Periode II)

Die renale Oxypurin-Ausscheidung fiel in Periode IV wieder ab; mangels eines steady state konnte kein Mittelwert gebildet werden.

Der Mittelwert der renalen Orotsäure-Ausscheidung (Abb.14):

- betrug in Periode I 1mg/die
- stieg in Periode II auf 9,7mg/die an
- fiel in Periode III auf 6,2mg/die ab (36% gegenüber Periode II)

Sie fiel in Periode IV wieder ab; der Mittelwert konnte nicht berechnet werden, da kein steady state vorhanden war.

Die Harnsäure-Konzentration im Serum (Abb.12, 13, 14):

- betrug in Periode I 5,95mg%
- fiel in Periode II auf 3,86mg%
- stieg in Periode III auf 5,38mg%

Sie stieg in Peride IV wieder an. Ein Mittelwert konnte jedoch nicht ausgerechnet werden, da kein steady state existierte.

(Tabelle I zeigt die gemessenen Harnsäure-Konzentrationen im Serum)

Die gleichzeitig durchgeführte Bestimmung der renalen Kreatinin-Ausscheidung ließ keine periodischen Schwankungen erkennen.

Tabelle II zeigt die gemessenen Mengen im 24-Std.-Urin von Harnsäure (HS), Oxypurinen (OP), Orotsäure (OS) in mg/die, sowie Kreatinin (Kreat.) in g/die, ferner das jeweilige Volumen des 24-Std.-Urins.

Tag	HS-Serum
1	6,2
3	5,7
5	5,0
7	3,9
9	3,8
11	3,4
13	3,2
15	3,5
17	5,0
19	5,1
21	5,4
23	5,4
25	6,0
27	8,0
29	7,9
	(mg%)

Tabelle I: gemessene Harnsäure-Konzentrationen im Serum in mg%

Tage	HS-Urin	OP-Urin	OS-Urin	Kreat.-Urin	Urin-Vol.
1	532	14	2,0	2,21	1650
2	310	13,4	0,1	2,20	800
3	365	23,3	1,0	2,54	1270
4	266	31	2,6	2,51	660
5	272	84	8,9	2,13	870
6	274	92	10,2	2,22	850
7	262	85	12,7	2,15	800
8	247	73	10,8	2,24	900
9	228	96	7,1	1,97	740
10	222	130	9,8	2,15	780
11	236	97	10,0	2,17	760
12	171	72	12,7	1,71	720
13	255	97	11,8	1,98	1000
14	252	160	3,7	1,95	740
15	447	205	3,9	2,63	860
16	299	218	5,3	2,19	660
17	476	285	3,2	2,41	850
18	346	203	2,1	1,71	620
19	497	276	8,0	2,53	1000
20	437	246	7,4	2,36	940
21	466	265	9,6	2,47	1260
22	438	225	10,6	2,33	1200
23	522	270	7,8	2,58	1060
24	589	126	4,8	2,43	760
25	701	97	2,3	2,19	970
26	654	104	0,7	1,81	830
27	856	17	0,1	2,13	920
28	554	3,2	1,1	2,14	800
	(mg/die)	(mg/die)	(mg/die)	(g/die)	(ml/die)

Tabelle II: absolute Mengen von Harnsäure, Oxypurinen, Orotsäure, Kreatinin im 24-Std.-Urin; 24-Std.-Urin-Volumen

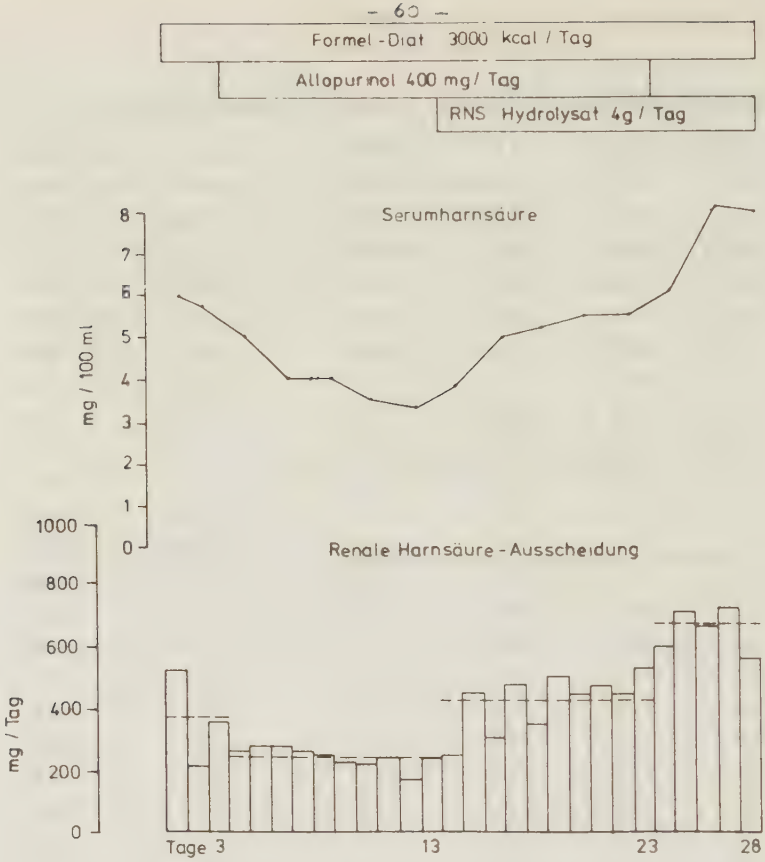

Abb.12: Harnsäure in Serum und Urin

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen
Ordinate: Harnsäure-Menge im Urin in mg/die
Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

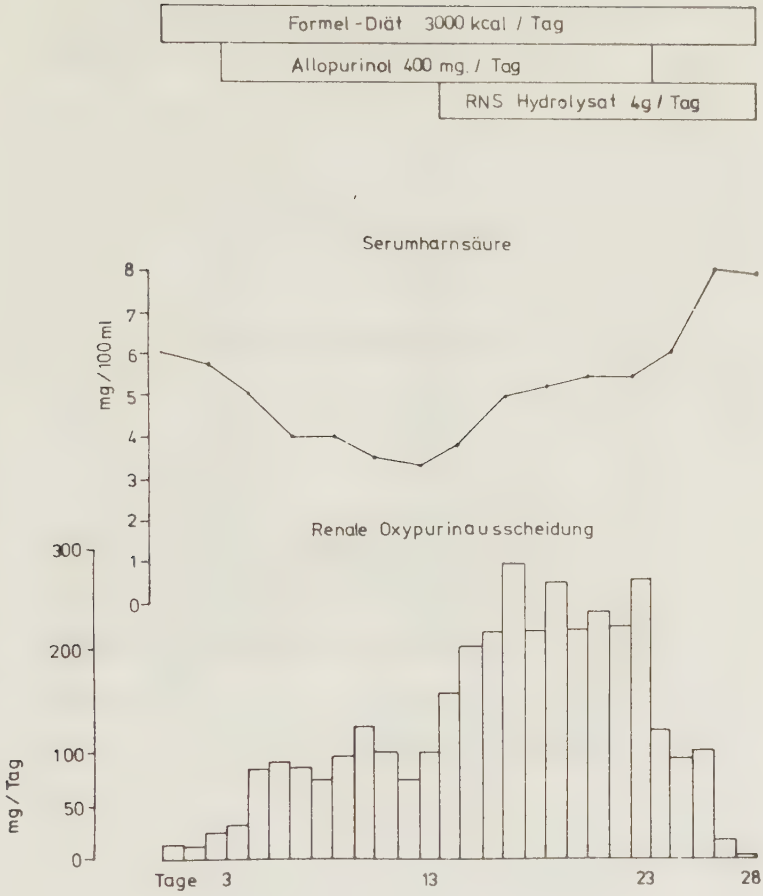

Abb.13: Renale Oxypurinausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen

Ordinate: Oxypurin-Menge in mg/die im Urin

Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

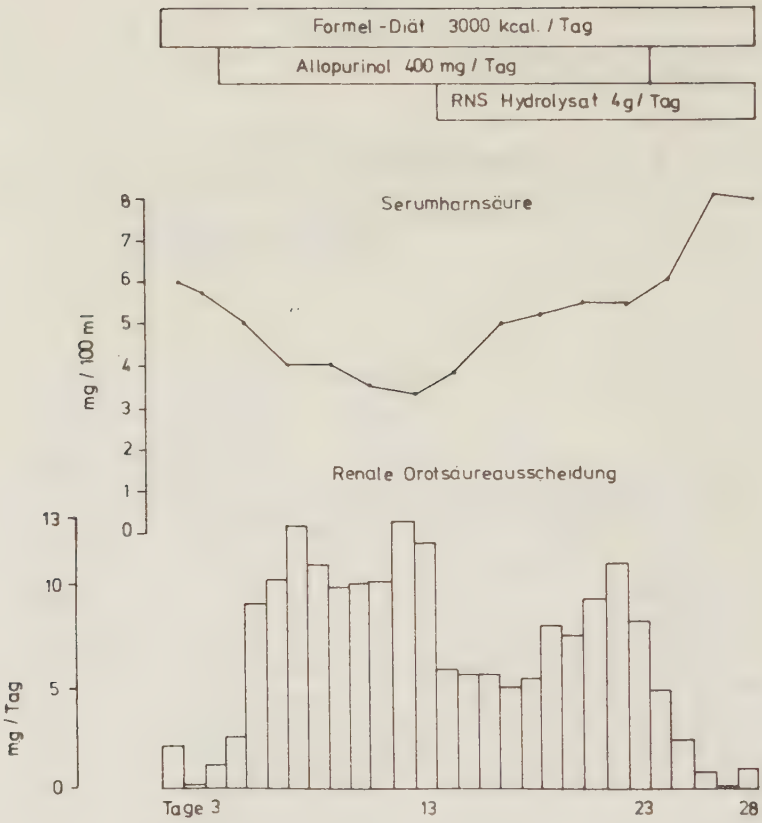

Abb.14: Renale Orotsäureausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen
Ordinate: Orotsäure-Menge im Urin in mg/die
Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Die spezifische Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuchs keine wesentliche Änderung auf. Tabelle III zeigt die errechneten spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez.Akt.
1	33,3	9502,6	85,0
3	30,8	7845,9	75,9
5	30,8	9218,7	89,1
7	30,4	8499,9	83,2
9	32,1	8918,5	82,8
11	31,2	8283,4	78,9
13	31,7	8177,5	76,8
15	30,0	8627,4	85,8
17	32,1	9986,4	92,7
19	32,1	9137,4	84,9
21	30,0	8427,0	83,7
23	27,1	7647,3	84,0
25	33,3	10498,6	93,9
27	27,9	7832,1	83,5
29	31,7	10266,3	96,4

Tabelle III: Spez.Akt. der HGPRT in nmol/mg Prot./h.
Eiweiß-Konzentration in $\frac{10^{-6}\,g}{10^{-6}\,l}$.

Die spezifische Aktivität der Adeninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuchs keine wesentliche Änderung auf.

Die spezifische Aktivität der Orotidyl-Dekarboxylase

- betrug in Periode I 0,0955nmol/mg Prot./h.
- stieg in Periode II auf 0,2064nmol/mg Prot./h.
- stieg in Periode III auf 0,2254nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode IV 0,2567nmol/mg Prot./h.

Ein signifikanter Anstieg der spezifischen Aktivität dieses Enzyms ließ sich nur gegenüber Periode I beobachten; die spezifische Aktivität stieg unter Allopurinol-Gabe von 0,0955 auf 0,2254 nMol/mg Prot./h. an. Tabelle IV zeigt die errechneten spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez.Akt.
1	1000	1959,5	0,112
3	840	1159,0	0,079
5	1015	3312,5	0,187
7	985	2700,5	0,157
9	1000	3723,0	0,213
11	965	3638,0	0,216
13	1025	4635,5	0,259
15	1000	3708,8	0,212
17	1140	4898,5	0,246
19	1105	4327,0	0,224
21	955	4273,0	0,256
23	1020	3082,0	0,173
25	1180	5701,5	0,276
27	1140	4898,5	0,246
29	1085	4704,0	0,248

Tabelle IV: spez. Akt. der ODC in nmol/mg Prot./h.
Eiweiß-Konzentration in $\frac{10^{-6}g}{10^{-6}l}$.

Die Ergebnisse von Versuchsperson "A" zeigen:

Die renale Harnsäure-Ausscheidung fiel in Periode II (Allopurinol-Gabe) auf 280mg/die gegenüber 370mg/die der Periode I ab; parallel dazu fiel die Serum-Harnsäure von 5,95mg% auf 3,56mg% ab. Die renale Oxypurin-Ausscheidung stieg von Periode I: 16,3mg/die auf 85,7mg/die in Periode II an; die renale Orotsäure-Ausscheidung stieg von 1mg/die in Periode I auf 9mg/die in Peride II an.

Während der Versuchsperiode III (Gabe von Allopurinol und RNS-Hydrolysat) sank die renale Orotsäure-Ausscheidung auf 6,2mg/die ab; die renale Harnsäure-Ausscheidung stieg auf 430mg/die, parallel dazu die Serum-Harnsäure auf 5,38mg%, und die renale Oxypurin-Ausscheidung auf 235,5mg/die an.

In Versuchsperiode IV (alleinige Gabe von RNS-Hydrolysat) stieg die renale Harnsäure-Ausscheidung wieder an. Parallel dazu war ein leichter Anstieg der Serum-Harnsäure zu verzeichnen, während die renale Oxypurin-Ausscheidung rückläufig war (kein steady state), und die renale Orotsäure-Ausscheidung zum Ausgangspunkt zurückging. Das Kreatinin-Profil wies keine periodischen Schwankungen auf.

Die spezifische Aktivität der HGPRT und APRT zeigten keine wesentlichen Änderungen.

Die spezifische Aktivität der ODC stieg in Periode II bis IV von 0,095 auf 0,2254nmol/mg Prot./h. stetig an.

6.2. Versuchsperson "B"

(Sie erhielt in Periode III und IV täglich 3g Guanin.)

Der Mittelwert der renalen Harnsäure-Ausscheidung (Abb. 15)

- betrug in Periode I 270mg/die
- fiel in Periode II auf 155mg/die ab
- stieg in Periode III auf 243mg/die an
  (57% gegenüber Periode II)

In Periode IV stieg die renale Harnsäure-Ausscheidung wieder an. Ein Mittelwert konnte nicht bestimmt werden, da kein steady state bestand.

Der Mittelwert der renalen Oxypurin-Ausscheidung (Abb. 16)

- betrug in Periode I 21,4mg/die
- stieg in Periode II auf 86,6mg/die an
- stieg in Periode III auf 115mg/die an
  (32,8% gegenüber Periode II)

Die renale Oxypurin-Ausscheidung fiel in Periode IV wieder ab; mangels eines steady state konnte kein Mittelwert gebildet werden.

Der Mittelwert der renalen Orotsäure-Ausscheidung (Abb. 17)

- betrug in Periode I 1,9mg/die
- stieg in Periode II auf 12,2mg/die an
- stieg in Periode III auf 13,6mg/die an
  (11,5% gegenüber Periode II)

Sie fiel in Periode IV wieder ab; der Mittelwert konnte nicht berechnet werden, da kein steady state vorhanden war.

Die Harnsäure-Konzentration im Serum (Abb. 15, 16, 17)

- betrug in Periode I 4,4mg%
- fiel in Periode II auf 2,62mg%
- stieg in Periode III auf 3,22mg%

Sie stieg in Periode IV wieder an. Ein Mittelwert konnte jedoch nicht ausgerechnet werden, da kein steady state existierte.

Tabelle V zeigt die gemessenen Harnsäure-Konzentrationen im Serum.

Tag	HS-Serum
1	5,0
3	3,8
5	3,6
7	2,8
9	2,8
11	2,1
13	1,8
15	2,9
17	3,3
19	3,1
21	3,2
23	3,2
25	3,8
27	4,9
29	4,7

Tabelle V: Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Die gleichzeitig durchgeführten Bestimmungen der renalen Kreatinin-Ausscheidung ließen keine periodischen Schwankungen erkennen.

Tabelle VI zeigt die gemessenen Mengen im 24-Std.-Urin von Harnsäure (HS), Oxypurinen (OP), Orotsäure (OS) in mg/die,

sowie Kreatinin (Kreat.) in g/die, ferner die 24-Std.-Urinvolumina.

Tag	HS-Urin	OP-Urin	OS-Urin	Kreat.-Urin	Urin-Vol.
1	272	10,4	1,68	1,58	1600
2	256	28	1,68	1,58	930
3	280	25,7	2,10	1,85	1100
4	210	75	4,90	1,65	1220
5	153	66	8,60	1,43	1200
6	162	101	8,60	1,83	970
7	180	73	13,20	1,83	1330
8	129	100	9,20	1,34	830
9	135	105	15,00	1,66	980
10	138	87	14,40	1,56	800
11	158	83,5	14,00	1,47	890
12	142	73,5	14,40	1,51	1030
13	120	102	10,60	1,82	760
14	150	122	17,50	1,38	940
15	217	116	13,80	1,75	820
16	245	99	17,10	1,52	1020
17	286	110	7,30	1,88	810
18	236	104	14,40	1,55	1060
19	226	85	18,20	1,48	860
20	268	80	8,00	1,69	620
21	250	124	11,30	1,57	870
22	280	123	15,50	1,72	1120
23	260	115	12,90	1,57	1060
24	294	47	7,00	1,38	760
25	347	41	4,00	1,40	1020
26	157	26	1,80	1,44	670
27	248	29,5	1,75	1,57	740
28	218	45	1,60	1,67	740
	(mg/die)	(mg/die)	(mg/die)	(g/die)	(ml/die)

Tabelle VI: absolute Mengen von Harnsäure, Oxypurinen, Orotsäure und Kreatinin im Urin; 24-Std.-Urinvolumina.

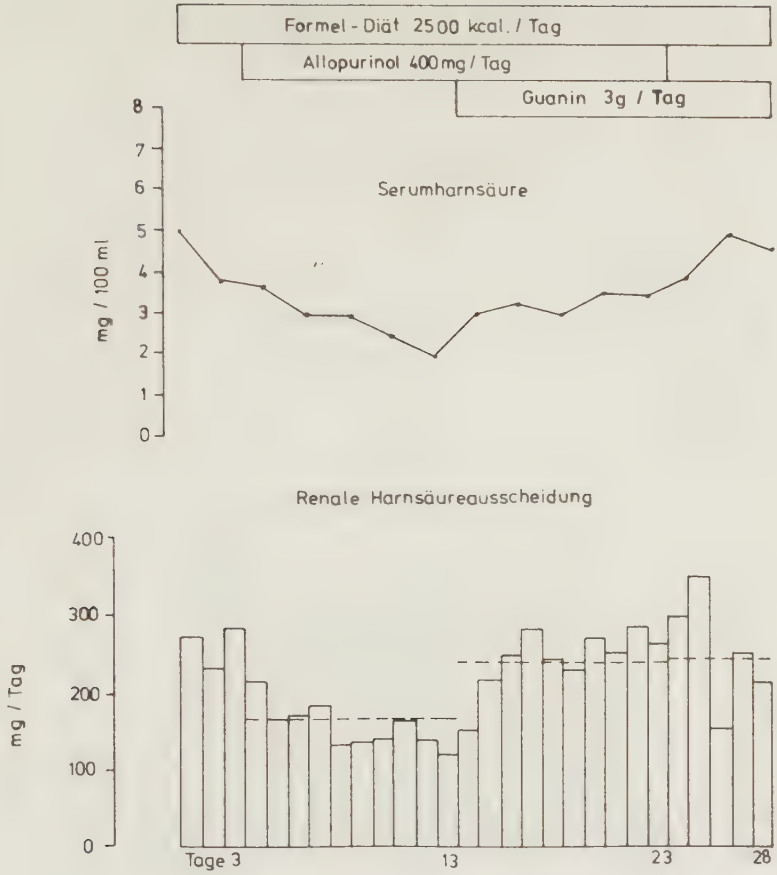

Abb.15: Harnsäure in Serum und Urin

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen
Ordinate: Harnsäure-Menge im Urin in mg/die
Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Abb.16: Renale Oxypurinausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen
Ordinate: Oxypurin-Menge in mg/die im Urin
Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

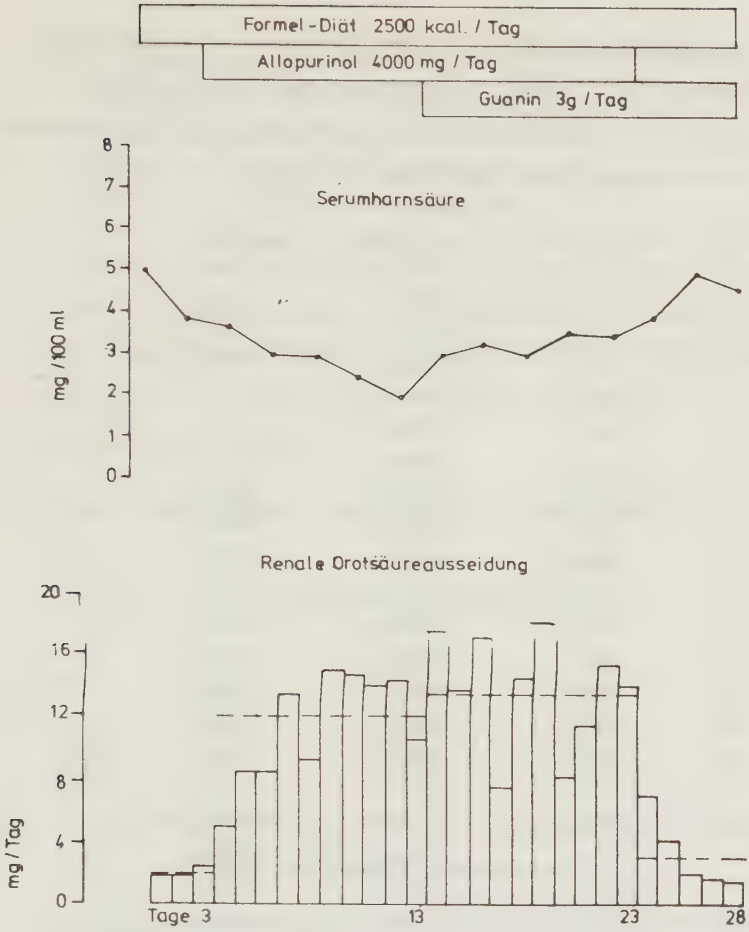

Abb.17: Renale Orotsäureausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen

Ordinate: Orotsäure-Menge im Urin in mg/die

Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Die spezifische Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuches keine wesentliche Änderung auf. Tabelle VII zeigt die errechneten spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez.Akt.
1	40	9671,8	72,0
3	41,6	8390,2	59,7
5	41,6	9309,7	66,6
7	43,5	9450,0	66,3
9	45,0	9724,8	64,3
11	43,3	8283,9	57,0
13	40,0	8323,3	61,9
15	43,4	9651,1	67,0
17	41,6	9487,6	67,9
19	bei der Dialyse verworfen		
21	31,7	5650,8	53,1
23	43,4	8222,2	57,0
25	44,2	9571,3	65,1
27	44,2	8790,3	59,8
29	37,6	6296,8	50,1

Tabelle VII: spez.Akt. der HGPRT in nmol/mg Prot./h.

Eiweiß-Konzentration in $\frac{10^{-6}\,g}{10^{-6}\,l}$.

Die spezifische Aktivität der Adeninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuches keine wesentliche Änderung auf.

Die spezifische Aktivität der Orotidyl-Dekarboxylase

- betrug in Periode I 0,067nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode II 0,123nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode III 0,169nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode IV 0,160nmol/mg Prot./h.

Ein signifikanter Anstieg der spez. Akt. dieses Enzyms ließ sich nur gegenüber Periode I beobachten; die spez. Akt. stieg unter Allopurinol-Gabe von 0,067 auf 0,169nmol/mg Prot./h. an. Tabelle VIII zeigt die errechneten spez. Akt. dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez. Akt.
1	990	1346	0,078
3	1010	993	0,056
5	965	1601	0,095
7	965	2124	0,126
9	1045	2598	0,142
11	1025	2191	0,122
13	980	2416	0,141
15	1000	3331	0,191
17	970	3172	0,187
19	----	----	-----
21	1020	2760	0,155
23	1020	3305	0,185
25	990	3935	0,227
27	1010	2970	0,168
29	1040	1570	0,086

Tabelle VIII: spez. Akt. der ODC in nmol/mg Prot./h.
Eiweiß-Konz. in $\frac{10^{-6}g}{10^{-6}l}$.

Die Ergebnisse von Versuchsperson "B" zeigen:

Die renale Harnsäure-Ausscheidung fiel in Periode II (Allopurinol-Gabe) auf 155mg/die gegenüber 270mg/die in Periode I ab; parallel dazu fiel die Harnsäure-Konzentration im Serum von 4,4 auf 2,62mg% ab. Die renale Oxypurin-Ausscheidung stieg von Periode I 21,4 auf 86,6mg/die in Periode II an, die renale Orotsäure-Auscheidung stieg von 1,9 in Periode I auf 12,2mg/die in Periode II an.

Während der Versuchsperiode II (Gabe von Allopurinol und Guanin) blieb die renale Orotsäure-Ausscheidung mit 13,6mg/die praktisch unverändert; die renale Harnsäure-Ausscheidung stieg auf 243mg/die, dazu parallel die Serum-Harnsäure auf 3,22mg/die; die renale Oxypurin-Ausscheidung stieg auf 115mg/die.

In Versuchsperiode IV (alleinige Gabe von Guanin) stiegen die renale Harnsäure-Ausscheidung und die Serum-Harnsäure wieder leicht an. Eine Mittelwertsbildung war wegen des Fehlens eines steady state nicht möglich. Die renale Oxypurin-Ausscheidung und die der Orotsäure kehrten zum Ausgangspunkt zurück.

Das Kreatinin-Profil wies keine periodischen Schwankungen auf.

Die spez. Akt. der HGPRT und APRT zeigten keine wesentlichen Änderungen.

Die spez. Akt. der ODC stieg in Periode II von 0,067 auf 0,169nmol/mg Prot./h. an.

6.3. Versuchsperson "C"

(3g Adenin täglich in Periode III und IV)

Der Mittelwert der renalen Harnsäure-Ausscheidung (Abb.18)

- betrug in Periode I 352mg/die
- fiel in Periode II auf 207,7mg/die ab
- stieg in Periode III auf 273,8mg/die an
  (32% gegenüber Periode II)

In Periode IV stieg die renale Harnsäure-Ausscheidung wieder an. Ein Mittelwert konnte nicht bestimmt werden, da kein steady state bestand.

Der Mittelwert der renalen Oxypurin-Ausscheidung (Abb. 19)

- betrug in Periode I 11,8mg/die
- stieg in Periode II auf 82,7mg/die
- stieg in Periode III auf 1328mg/die
  (1510% gegenüber Periode II)

Die renale Oxypurin-Ausscheidung fiel in Periode IV wieder ab; mangels eines steady state konnte kein Mittelwert gebildet werden.

Der Mittelwert der renalen Orotsäure-Ausscheidung (Abb. 20)

- betrug in Periode I 3,4mg/die
- stieg in Periode II auf 34,5mg/die an
- fiel in Periode III auf 30,8mg/die ab
  (10% gegenüber Periode II)

Sie fiel in Periode IV wieder ab; der Mittelwert konnte nicht berechnet werden, da kein steady state vorhanden war.

Die Harnsäure-Konzentration im Serum (Abb. 18, 19, 20)

- betrug in Periode I 4,9mg%
- fiel in Periode II auf 2,55mg%
- stieg in Periode III auf 3,79mg%

Die Harnsäure-Konzentration im Serum stieg in Periode IV wieder an. Ein Mittelwert konnte jedoch nicht ausgerechnet werden, da kein steady state existierte.

Tabelle IX zeigt die gemessenen Harnsäure-Konzentrationen im Serum.

Tag	HS-Serum
1	4,95
3	4,80
5	2,75
7	2,85
9	2,55
11	2,50
13	2,10
15	3,00
17	3,65
19	4,35
21	3,85
23	4,10
25	6,45
27	10,00
29	15,00 !!

Tabelle IX: Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Die gleichzeitig durchgeführten Bestimmungen der renalen Kreatinin-Ausscheidung ließen keine periodischen Schwankungen erkennen.

Tabelle X zeigt die gemessenen Mengen im 24-Std.-Urin von Harnsäure, Oxypurinen, Orotsäure in mg/die, von Kreatinin in g/die, sowie die 24-Std.-Urinvolumina.

Tag	HS-Urin	OP-Urin	OS-Urin	Kreat.-Urin	Urin-Vol.
1	360,5	23,7	3,9	1,33	1780
2	329,4	7,2	3,0	1,35	2160
3	367,5	4,9	3,3	1,74	980
4	323,3	16,5	11,1	1,22	1220
5	235,2	48,0	30,9	1,36	960
6	222,7	86,0	35,7	1,62	1620
7	179,3	84,5	30,0	1,44	1630
8	193,2	84,0	33,9	1,62	1120
9	159,5	100,0	34,8	1,44	1100
10	162,3	73,0	38,0	1,40	1100
11	211,5	105,0	48,0	1,82	1880
12	198,0	108,0	41,8	1,88	1320
13	192,5	122,0	39,0	1,53	1400
14	149,1	690	28,4	1,26	1420
15	244,5	1240	35,0	1,64	1460
16	323,0	1410	36,4	1,86	1900
17	320,4	1520	32,0	1,64	1780
18	356,7	1650	34,8	1,98	1740
19	284,7	970	23,1	1,47	1560
20	296,4	1540	31,2	1,79	1560
21	133,2	1380	36,0	1,48	1300
22	335,0	1520	32,4	1,79	2000
23	293,7	1360	28,4	1,59	1780
24	427,2	1300	27,0	1,80	1780
25	734,0	680	18,0	1,80	1570
26	679,2	310	13,5	1,73	1010
27	891,0	184	10,5	1,99	1080
28	610,5	194	7,5	1,53	1320
	(mg/die)	(mg/die)	(mg/die)	(g/die)	(ml/die)

Tabelle X: absolute Mengen von Harnsäure, Oxypurinen, Orotsäure und Kreatinin im Urin; 24-Std.-Urinvolumina.

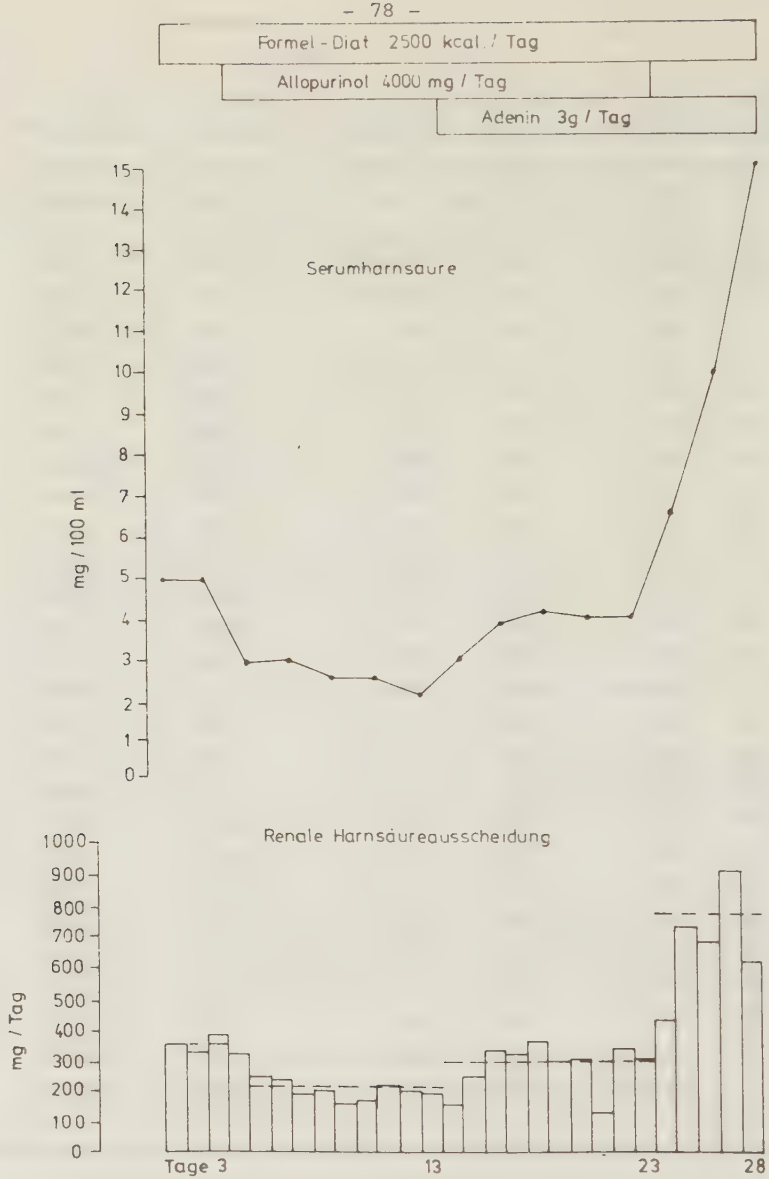

Abb.18: Harnsäure in Serum und Urin

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen

Ordinate: Harnsäure-Menge im Urin in mg/die

Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Abb.19: Renale Oxypurinausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen

Ordinate: Oxypurin-Menge in mg/die im Urin

Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Abb.20: Renale Orotsäureausscheidung

Abszisse: Versuchsdauer in Tagen

Ordinate: Orotsäure-Menge im Urin in mg/die

Harnsäure-Konzentration im Serum in mg%

Die spezifische Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuches keine wesentliche Veränderung auf. Tabelle XI zeigt die errechneten spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez.Akt.
1	31,2	12843,1	122,4
3	32,5	11520,0	105,6
5	33,3	13969,3	124,9
7	33,7	14643,6	129,3
9	38,3	17100,0	133,0
11	32,9	13612,9	123,3
13	31,7	11695,6	109,9
15	33,3	13532,1	121,0
17	25,0	10867,0	129,4
19	35,0	16902,1	143,8
21	33,7	15276,6	134,8
23	34,2	14159,7	123,3
25	32,9	15622,5	141,4
27	31,2	15414,6	146,8
29	30,0	13680,6	135,9

Tabelle XI: spez. Akt. der HGPRT in nmol/mg Prot./h.

Eiweiß-Konz. in $\frac{10^{-6}g}{10^{-6}l}$.

Die spezifische Aktivität der Adeninphosphoribosyl-Transferase wies während des Versuches keine wesentliche Änderung auf.

Die spezifische Aktivität der Orotidyl-Dekarboxylase

- betrug in Periode I 0,304nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode II 0,441nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode III 0,484nmol/mg Prot./h.
- betrug in Periode IV 0,502nmol/mg Prot./h.

Ein signifikanter Anstieg der spez. Akt. dieses Enzyms ließ sich gegenüber Periode I beobachten; die spez. Akt. stieg unter Allopurinol-Gabe stetig an. Tabelle XII zeigt die errechneten spez. Akt. dieses Enzyms.

Tag	Eiweiß-Konz.	counts/min.	spez. Akt.
1	970	5571,5	0,329
3	1000	4886,5	0,280
5	920	6527,5	0,406
7	970	7442,0	0,439
9	1030	9184,5	0,508
11	1080	8069,0	0,427
13	970	7190,5	0,424
15	1030	7043,0	0,391
17	975	4728,5	0,377
19	1050	11886,5	0,648
21	1035	11227,0	0,621
23	1070	8996,5	0,481
25	1090	10107,5	0,531
27	1070	10217,5	0,546
29	1090	8235,5	0,432

Tabelle XII: spez. Akt. der ODC in nmol/mg Prot./h.
Eiweiß-Konz. in $\frac{10^{-6}g}{10^{-6}l}$.

Die Ergebnisse von Versuchsperson "C" zeigen:

Die renale Harnsäure-Ausscheidung fiel in Periode II (Allopurinol-Gabe) auf 202mg/die gegenüber 352mg/die in Periode I ab, parallel dazu fiel die Harnsäure-Serumkonzentration von 4,9 auf 2,55mg% ab. Die renale Oxypurin-Ausscheidung stieg von 11,8mg/die in Periode I auf 82,7 mg/die in Periode II an, die Orotsäure-Ausscheidung von 3,4 auf 34,5mg/die.

Während Versuchsperiode III (Gabe von Allopurinol und Adenin) blieb die renale Orotsäure-Ausscheidung mit 30,8mg/die weitgehend unverändert; die Harnsäure-Ausscheidung im Urin stieg auf 273,7mg/die, wiederum parallel dazu auch die Harnsäure-Serumkonzentration auf 3,79mg%; Die renale Oxypurin-Ausscheidung stieg sehr stark auf 1328mg/die.

In Versuchsperiode IV (alleinige Gabe von Adenin) stieg die renale Harnsäure-Ausscheidung weiter an. Die Harnsäure-Serumkonzentration nahm kontinuierlich bis auf 15mg% zu. Die renale Oxypurin- und Orotsäure-Ausscheidung nahmen kontinuierlich ab.

Das Profil der renalen Kreatinin-Ausscheidung wies keine periodischen Schwankungen auf.

Die spez. Akt. der HGPRT und APRT wiesen keine wesentlichen Änderungen auf.

Die spez. Akt. der ODC stieg von 0,304nmol/mg Prot./h. in Periode I konstant durch die anderen Perioden auf 0,484 nmol/mg Prot./h. an.

7. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß die drei Versuchssubstanzen RNS-Hydrolysat, Adenin und Guanin die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie in verschiedenem Maße beeinflussen. Der deutlichste Effekt konnte dabei bei RNS-Hydrolysat beobachtet werden:

Die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie wurde durch die Gabe von 4g RNS-Hydrolysat pro Tag um 36% vermindert. Die Gabe von unhydrolysierter Ribonukleinsäure führte zu demselben Effekt, wie Zöllner und Gröbner 1971 zeigen konnten.(53).

Auch die Purinbase Adenin (3g/die) hatte eine Verminderung der renalen Orotsäure-Ausscheidung unter Allopurinol-Gabe von 10% zur Folge. Frühere Untersuchungen mit Adenosin (3g/die) erbrachten ähnliche Ergebnisse. Auch die Nukleoside Cytosin, Uridin und Guanosin, jeweils 3g/die gegeben, übten denselben Effekt aus. AMP (1g/die) übte dagegen keinen Einfluß aus. Bei der alleinigen Gabe von Adenin (3g/die) nach Absetzen des Allopurinol stieg die Serum-Harnsäure bis auf einen Wert von 15mg% an. Da dieser Wert zu Harnsäure-Ausfällungen in der Niere führen kann, sollte eine Versuchsanordnung mit Adenin 3g/die nicht mehr durchgeführt werden. Es war nicht erwartet worden, daß die schwerlösliche Purinbase Adenin so gut resorbiert werden würde (vgl. Guanin).

Eine Reduzierung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie bei Gabe von Guanin (3g/die) konnte nicht nach-

gewiesen werden. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, führten sowohl Guanosin (3g/die) als auch AMP (3g/die) zu einer Reduktion der renalen Orotsäure-Ausscheidung unter Allopurinol-Gabe. Die Erklärung liegt wohl in einer durch Unlöslichkeit von Guanin bedingten geringen Resorption aus dem Magendarmtrakt.

Die gewonnenen Ergebnisse sprechen für eine Hemmung der Pyrimidinsynthese des Menschen durch die in der RNS enthaltenen Nukleotide GMP, CMP, UMP sowie der Purinbase Adenin. Dabei zeigt sich unter Gabe von Adenin und Allopurinol im Gegensatz zu RNS und Allopurinol ein wesentlich geringeres Ansteigen der renalen Harnsäure-Ausscheidung, stattdessen aber eine weitaus höhere Oxypurin-Ausscheidung im Urin. Dies spricht für eine stärkere Hemmung des Enzyms Xanthinoxidase bei gleicher Allopurinol-Dosierung.

Die spezifische Aktivität der Orotidyldekarboxylase stieg in den drei Versuchen unter Allopurinol-Gabe an. Dieser Anstieg beruht wahrscheinlich auf einer Enzymstabilisierung in den Erythrozyten.

Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme Hypoxanthinguanin-phosphoribosyltransferase und Adeninphosphoribosyltransferase zeigten während des Versuchs keine wesentliche Änderung.

8. Zusammenfassung

Die kontinuierliche Gabe von Allopurinol führt zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin.1971 zeigten Zöllner und Gröbner(53),dass diese durch Allopurinol hervorgerufene Orotazidurie durch zusätzliche Gabe von Ribonukleinsäure weitgehend aufgehoben wird.

Die vorliegende Arbeit untersuchte,ob auch Ribonukleinsäure-Hydrolysat,sowie die Purinbasen Adenin und Guanin diese durch Allopurinol hervorgerufene Orotazidurie ändern.

Drei gesunde Versuchspersonen im Alter von 26 und 27 Jahren erhielten über einen Zeitraum von 28 Tagen eine isoenergetische,purinfreie Formeldiät,die aus 55% Kohlenhydraten,30% Fett und 15% Eiweiss bestand.

Täglich wurden enzymatisch Serumharnsäure,sowie die Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen im Urin bestimmt.Die renale Orotsäure-und Kreatinin-Ausscheidung wurde colorimetrisch gemessen.Die Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase,Adeninphosphoribosyltransferase und Orotidyldekarboxylase erfolgte mikroradiochemisch.

Während der 28.tägigen Versuchsdauer wurde die ersten drei Tage die Diät allein verabreicht;anschliessend erhielten alle drei Versuchspersonen zehn Tage lang Allopurinol 400mg/die in vier Einzelportionen täglich. Für weitere zehn Tage wurde dann bei je einer Versuchsperson 4g Ribonukleinsäure-Hydrolysat,3g Adenin bzw. 3g Guanin zugesetzt.Die letzten fünf Versuchstage wurde Allopurinol abgesetzt,und nur noch RNS-Hydrolysat, Adenin bzw. Guanin weitergegeben.
Unter der zehntägigen alleinigen Verabreichung von Allopurinol kam es bei allen drei Versuchspersonen zu einem Abfall der Serumharnsäure und der renalen Harnsäureausscheidung,während im gleichen Zeitraum die renale Elimination von Orotsäure und Oxypurinen anstieg.

Die zusätzliche zehntägige Gabe von RNS-Hydrolysat 4g/die verursachte einen Rückgang der renalen Orotsäureausscheidung,während Serumharnsäure sowie Ausscheidung von Harnsäure und Oxypurinen im Urin anstiegen.Absetzen von Allopurinol und alleinige Weitergabe von RNS-Hydrolysat führte zu einem weiteren Rückgang der renalen Orotsäure-Elimination,die Oxypurinausscheidung im Urin nahm ebenfalls ab,während Serumharnsäure und renale Harnsäureausscheidung zunahmen.

Prinzipiell die gleichen Ergebnisse konnten mit Adenin 3g/die erzielt werden. Die Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie war jedoch gegenüber RNS-Hydrolysat 4g/die geringer, nämlich um etwa ein Drittel.

Die Gabe von Guanin 3g/die erbrachte keinen Einfluss auf die renale Orotsäureausscheidung unter Allopurinol; zusammen mit der Beobachtung, dass auch die renale Oxypurin-Ausscheidung gegenüber RNS-Hydrolysat und Adenin weitgehend gleich blieb, liess dies den Schluss zu, dass Guanin nur vermindert aus dem Magendarmtrakt resorbiert wird.

Die Hemmung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie durch RNS-Hydrolysat und Adenin könnte auf eine Hemmung der Pyrimidinsynthese de novo dieser Verbindungen zurückzuführen sein.

Die spezifische Aktivität der Orotidyldekarboxylase stieg bei allen drei Versuchspersonen unter Allopurinolgabe an. Dieser Anstieg beruht wahrscheinlich auf einer Enzymstabilisierung in den Erythrozyten.

Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase und Adeninphosphoribosyltransferase zeigten während des Versuches keine wesentliche Änderung.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1) BEARDMORE T.D., CASHMON J.S., KELLEY W.N.:
Mechanism of allopurinol-mediated increase in enzyme activity in man.
J.clin.Invest. 51, 1823 (1972)

2) BEARDMORE T.D., KELLEY W.N.: Mechanism of allopurinol-mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis.
J.Lab.clin.Med. 78, 696 (1971)

3) BECKER M.A., MEYER L.J., SEEGMILLER J.E.: Gout with Purine overproduction resulting from PrPP-Synthetase activity.
Clin. Res. 21, 217 (1973)

4) CASKEY C.T., ASHTON D.M., WYNGAARDEN J.B.: The Enzymology of Feedback Inhibition of Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase by Purine Ribonucleotides.
J.Biol.Chem. 239, 2570 (1964)

5) CHOW D.C., KAWAHARA F.S., SAUNDERS T., SORENSEN L.B.:
A new Assay Method for Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase.
J.Lab.Clin.Med. 76,(5), 733 (1970)

6) DELBARRE F., AMOR B., AUSCHER C., DeGERY A.: Treatment of gout with allopurinol, a study of 106 cases.
Ann. Rheum.Dis. 25, 627 (1966)

7) ELION G.B., CALLAHAN S., NATHAN H., BIEBER S.:
RUNDLES R.W., HITCHINGS G.H.: Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.
Ann.Rheum.Dis. 25, 608 (1966)

8) EMMERSON B.T.: Discussion. Symposion on allopurinol.
Ann.Rheum.Dis. 25, 622 (1966)

9) FOX I.H., WYNGAARDEN J.B., KELLEY W.N.: Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man, a newly observed effect of allopurinol.
New. Engl. J.Med. 283, 1177 (1970)

10) FOX I.H.: Purine ribonucleotide catabolism: Clinical and biochemical significance.
Nutr.Metab. 16, 65 (1974)

11) FOX R.M., O'SULLIVAN W.J., FIRKIN B.G.: Orotic aciduria. Differing enzyme patterns.
Amer.J.Med. 47, 332 (1969)

12) FOX R.M., ROYSE-SMITH D., O'SULLIVAN W.J.: Orotidinuria induced by allopurinol.
Science 168, 861 (1970)

13) FOX R.M., WOOD M.H., O'SULLIVAN W.J.: Studies on the coordinate activity and lability of orotidylate phosphoribosyltransferase and decarboxylase in human erythrocytes, and the effects of allopurinol administration.
J.Clin.Invest. 50, 1050 (1971)

14) FOX R.M., WOOD R.H., ROYSE-SMITH D., O'SULLIVAN W.J.: Hereditary orotic aciduria: types I and II.
Amer.J.Med. 55, 791 (1973)

15) GERHART J.C., PARDEE A.B.: The enzymology of control by feedback inhibition.
J.Biol.Chem. 237, 891 (1962)

16) GRÖBNER W.: Veränderungen des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol.
Habilitationsschrift (1974)

17) GRÖBNER W., KELLEY W.N.: Effect of allopurinol and its metabolic derivates on the configuration of human orotate phosphoribosyletransferase and orotidin-5-phosphate-decarboxylase.
Biochem.Pharmachol. 24, 379 (1975)

18) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.: Beeinflussung der Purin- und Pyrimidinsynthese durch Allopurinol.
Klin.Wschr. 53, 255 (1975)

19) GRÖBNER W., ZÖLLNER N.: Moderne Aspekte zur Pathophysiologie der familiären Hyperurikämie.
Klin.Wschr. 95, 94 (1975)

20) HARTMAN S.C.: Purines and Pyrimidines: in "Metabolic Pathways" (D.M. GREENBERG ed.).
3.Aufl. 4, 1-53 (1971) Academ. Press, New York

21) HITCHINGS G.H.: Effect of allopurinol in relation to purine biosynthesis.
Ann.Rheum.Dis. 25, 601 (1966)

22) HOLMES E.W., McDONALD J.A!, McCORD J.M., WYNGAARDEN J.B., KELLEY W.N.: Human glutamine phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase: Kinetic and regular properties.
J.Biol.Chem. 248, 144 (1973)

23) JONES M.E.: Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis in mammals.
Adv.Enzyme Regul. 9, 19 (1971)

24) JONES O.W., ASHTON D.M., WYNGAARDEN J.B.: Accelerated turnover of phosphoribosylpyrophosphate, a purine nucleotide precursor, in certain gouty subjects.
J.Clin.Invest. 41, 1805 (1962)

25) KELLEY W.N.: Purine- and pyrimidine metabolism of cells in culture. Growth, metabolism and nutrition in cells in culture.
Acad.Press Ind. New York-London 1, (1972)

26) KELLEY W.N., BEARDMORE T.D.: Allopurinol: Alteration in pyrimidine metabolism in man.
Science 169, 388 (1970)

27) KELLEY W.N., BEARDMORE T.D.: Orotidyle decarboxylase Assay.
Science 169, 388 (1970)

28) KELLEY W.N., GRÖBNER W., HOLMES E.: Current concepts in the pathogenesis of hyperuricämica.
Metabolism 22, 939 (1973)

29) KELLEY W.N., ROSENBLOOM F.M., MILLER J., SEEGMILLER J.E.: An enzymatic basis for variation in response to allopurinol. Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase-deficiency.
New Engl.J.Med. 278, 287 (1968)

30) KELLEY W.N., WYNGAARDEN J.B.: Effects of dietary purine restriction, allopurinol and oxypurinol on the urinary excretion of ultraviolet-absorbing combounds.
Clin. Chem. 16, 707 (1970a)

31) KELLEY W.N., WYNGAARDEN J.B.: Effects of allopurinol and oxypurinol on purine synthesis in cultured human cells.
J.Klin.Invest. 49, 602 (1970b)

32) KLINENBERG J.R., GOLDFINGER S.E., BRADLEY K.H., SEEGMILLER J.E.: An Enzymatic Spektrophotometric Deter-

mination of Xanthine and Hypoxanthine.
Clin.Chem. 13, 834 (1967)

33) KLINENBERG J.R., GOLDFINGER S.E., SEEGMILLER J.E.: The effectiveness of the xanthine oxydase inhibitor allopurinol in the treatment of the gout.
Ann.Intern.Med. 62, 639 (1965)

34) KRENITSKY T.A., ELION G.B., STRELITZ R.A., HITCHINGS G.H.: Ribonucleosides of allopurinol and oxoallopurinol.
J.Biol.Chem. 242, 2675 (1967)

35) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L.A., RANDALL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

36) McCOLLISTER R.J., GILBERT W.R., ASHTON D.M., WYNGAARDEN J.B.: Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptopurine ribonucleotide and other purine analogues.
J.Biol.Chem. 239, 1560 (1964)

37) PRAETORIUS E., POULSEN H.: Enzymatic determination of uric acid with detailed directions.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 5, 273 (1953)

38) ROGERS L.E., PORTER F.S.: Hereditary orotic aciduria. A urinary screening test.
Pediatrics, Vol. 42/3, 423 (1968)

39) RUNDLES R.W., METZ E.N., SILBERMAN H.R.: Allopurinol in the treatment of gout.
Ann.Intern.Med. 64, 229 (1966)

40) RUNDLES R.W., SILBERMAN H.R., HITCHINGS G.H., ELION G.B.: Effects of xanthine oxydase inhibitor on clinical manifestations and purine metabolism in gout.
Ann.Intern.Med. 60, 717 (1964)

41) RUNDLES R.W., WYNGAARDEN R.B., HITCHINGS G.H., ELION G.B., SILBERMAN H.R.: Effects of xanthine oxydase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricemia and gout.
Trans.Ass.Amer.Phycns. 76, 126 (1963)

42) SEEGMILLER J.E., ROSENBLOOM F.M., KELLEY W.N.: Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis.
Science 155, 1682 (1967)

43) SMITH L.H.JR.: Pyrimidine metabolism in man.
New Engl.Journ. of Med. 288, 764 (1973)

44) SMITH L.H.JR., HUGULEY C.M.JR., BRIAN J.A.: Hereditary orotic aciduria. The metabolic basis of inherited disease.
Third ed., ed. by: STANBURRY J.B., WYNGAARDEN J.B., FREDRICKSON D.S., p. 1003, McGraw-Hill, New York (1972)

45) WORTHY T.E., GRÖBNER W., KELLEY W.N.: Hereditary orotic aciduria: evidence for a structural gene mutation.
Proc. Nat.Acad.Sci. U.S.A. 71, 3031 (1974)

46) WYNGAARDEN J.B., KELLEY W.N.: Gout: The metabolic basis of inherited disease.
Third ed., ed. by: STANBURRY J.B., WYNGAARDEN J.B., FREDRICKSON D.S., p. 889, McGraw-Hill, New York (1972)

47) WYNGAARDEN J.B., RUNDLES R.W., METZ E.N.: Allopurinol in the treatment of gout.
Ann.Intern.Med. 62, 842 (1965)

48) WYNGAARDEN J.B., RUNDLES R.W., SILBERMAN H.R., HUNTER S.: Control of hyperuricemia with hydroxypyrazolonpyrimidine, a purine analogue, which inhibits uric acid synthesis.
Arthr. and Rheum. 6, 306 (1963)

49) YÜ T.F., GUTMAN A.B.: Effect of allopurinol (4-hydroxypyrazolo-(3,4d)-pyrimidine) on serum and urinary uric acid in primary and secondary gout. Amer.J.Med. 37, 885 (1964)

50) ZÖLLNER N.: Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung. Normalwerte in der deutschen Bevölkerung. Z.Klin.Chem.Biochem. 1, 178 (1963)

51) ZÖLLNER N.: Die Behandlung der Gicht und der Uratnephrolithiasis mit Allopurinol. Verh.dtsch.Ges.Inn.Med. 72, 781 (1966)

52) ZÖLLNER N., GRÖBNER W.: Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote. Europ.J.Clin.Pharmacol. 3, 56 (1970)

53) ZÖLLNER N., GRÖBNER W.: Influence of oral ribonucleic acid on orotaciduria due to allopurinol administration. Z.ges.exp.Med. 156, 317 (1971)

54) ZÖLLNER N., SCHATTENKIRCHNER M.: Allopurinol in der Behandlung der Gicht und der Harnsäurenephrolithiasis. Dtsch.Med.Wschr. 92, 654 (1967)

Herrn Professor Dr.med.N. Zöllner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Medizinischen Poliklinik durchführen zu dürfen.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med.W. Gröbner für die bereitwillige Unterstützung bei der Planung und Durchführung des Versuchs, sowie für die Durchsicht des Manuskripts.
Zuletzt bin ich den Versuchspersonen zu Dank verpflichtet, die durch ihre Ausdauer die vorliegende Arbeit erst ermöglicht haben.

LEBENSLAUF

Am 31. Mai 1950 wurde ich als einziges Kind des Elektrikers Georg Justl und seiner Ehefrau Barbara Justl, geborene Elbl in Augsburg geboren.
Von 1956-1960 besuchte ich die Wittelsbacher-Volksschule Augsburg und trat anschließend in das mathematisch-naturwissenschaftliche Holbein-Gymnasium Augsburg über, wo ich 1969 das Abitur ablegte.
Während meines Zivilen Ersatzdienstes von 1970 bis 1971 war ich als Hilfspfleger in der Alten- bzw. Krankenpflege tätig.
Im Wintersemester 1971 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München auf, das ich im Mai 1978 mit der Approbation abschloß.
Das Praktische Jahr leistete ich in jeweils viermonatigen Abschnitten an der I. Medizinischen Klinik Augsburg (Innere Medizin), an der II. Chirurgischen Klinik Augsburg (Chirurgie) und an der I. Frauenklinik München (Gynäkologie) ab.
Seit dem 15. Juni 1978 befinde ich mich in der Weiterbildung zum Arzt für Allgemeinmedizin: bereits abgeleistet habe ich achtzehn Monate Weiterbildung in der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Donauwörth, sowie ein Jahr Chirurgie im Kreiskrankenhaus Krumbach. Seit dem 1. März 1981 arbeite ich als Assistent bei einem zur Weiterbildung ermächtigten Arzt für Allgemeinmedizin in Dinkelscherben.